

GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG DES STOFFWECHSELS VON
ÖSTRADIOL UND CORTISON IN ORGANEN DER RATTE UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER ÖSTRADIOLWIRKUNG
AUF DEN UTERUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd Hieronimus
aus Berlin

Berlin 1971

**GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG DES STOFFWECHSELS VON
ÖSTRADIOL UND CORTISON IN ORGANEN DER RATTE UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER ÖSTRADIOLWIRKUNG
AUF DEN UTERUS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd Hieronimus
aus Berlin

Berlin 1971



1. Gutachter : Prof. Dr. M. W e n z e l
2. Gutachter : Prof. Dr. G. S c h e n c k

Tag der mündlichen Prüfung: 7..Juli 1971

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. W e n z e l in der Radioisotopenabteilung des Pharmazeutischen Institutes der Freien Universität.

Herrn Prof. Dr. M. W e n z e l bin ich für das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegen brachte, und für wertvolle Anregungen und Diskussionen aufrichtig dankbar.

Mein Dank gilt ferner Fräulein B. B o l l e r t für ihre technische Hilfe.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

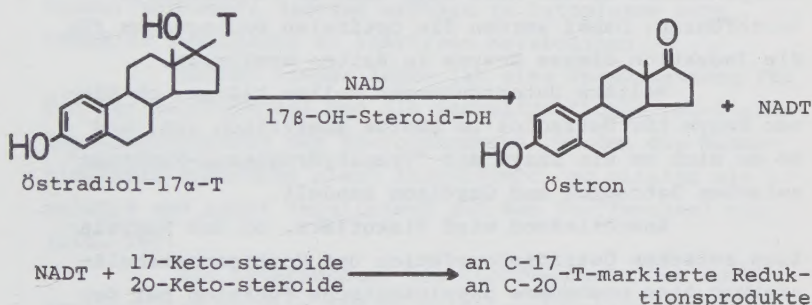
https://archive.org/details/IA41548807_0043

INHALT

	Seite
A. Einführung und Problemstellung	1
B. Einleitender Überblick	3
C. Ergebnisse	8
C.1. Die Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison in Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten	
C.1.1. Stoffwechsel von Cortison und Identifizierung der Metabolite	8
C.1.2. Einfluß der verschiedenen Parameter auf den Wasserstoff-Transfer	13
C.1.3. Sexualspezifität	22
C.1.4. Der Einfluß der Steroidkonzentrationen auf die Tritium-Übertragung	24
C.2. Organspezifität	34
C.3. Beeinflussung der Östradioloxydation in vivo und in vitro durch Cortison	39
C.4. Östradioloxydation im Rattenuterus	42
C.5. Induktion der Oxydoreduktase im Uterus nach hormonaler Vorbehandlung	46
C.6. Charakterisierung der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	57
C.7. Gibt es eine Parallelität zwischen Östradioloxydation und Tritium-Transfer durch die uterine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase?	62
C.8. Tritium-Transfer von Östradiol-17 α -T auf Cortison, Progesteron und 5 α -Androsten(3)-on(17) in verschiedenen Organen nach hormonaler Vorbehandlung	67
D. Diskussion	69
E. Material und Methodik	83
F. Zusammenfassung	94
G. Literatur	96

A. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Wenzel und Mitarbeiter (Lit. 1, 2, 3) fanden in weiblichen und männlichen Rattenorganen Enzyme oder Enzymsysteme, bei denen das bei der Oxydation von Östradiol-17 α -T zu Östron abgespaltene Tritium-Hydridion Androstendion und Progesteron reduziert. Wenzel und Mützel (Lit. 4) bestätigten den biochemischen Antagonismus zwischen Hydroxy- und Ketosteroiden an biologisch unwirksamen Steroiden und wiesen erstmals den Verlauf des Wasserstoff-Transfers in vivo nach. Diese Reaktionen lassen sich folgendermaßen formulieren:



In der vorliegenden Arbeit wird im ersten Teil aufgezeigt, daß das Nebennierenrindenhormon Cortison ebenfalls als Wasserstoff-Akzeptor fungieren kann. Der Einfluß des Cortisons auf den Östradiolstoffwechsel wird mit Hilfe der Radiospirometrie nachgewiesen. Da seit einiger Zeit bekannt ist; daß die an der Steroidhydrierung beteiligten Enzyme geschlechtsabhängig sind, werden die Versuche mit Organen männlicher und weiblicher Ratten durchgeführt, um etwaige Geschlechtsspezifitäten nachzuweisen (Lit. 5-9).

Durch Untersuchungen von Jensen et al. (Lit. 10) ist bekannt, daß im Uterus, einem Zielorgan der Östrogene, Östradiol zwar an einen Rezeptor gebunden ist, aber im Uterus nicht oxydiert werden soll. Neuere Arbeiten von Jütting (Lit. 11) und Lehmann (Lit. 12)

beweisen - entgegen den Befunden von Jensen -, daß im Uterus Östradiol zu Östron oxydiert wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll gezeigt werden, daß sich bei Rattenweibchen eine geringe cyclusabhängige Östradioloxydation nachweisen läßt, die durch Anwesenheit anderer Steroide beeinflusst werden kann. Die maximale Östradioloxydation tritt im Östrus-Stadium auf. Die Vermutung, daß die Aktivität der 17 β -Oxydoreduktase vom Östradiolspiegel im Organismus abhängt, konnte Jütting 1970 erstmals nachweisen (Lit. 11). Die Erhöhung der Konzentration von 17 β -Östradiol im Organismus bewirkt eine Zunahme der Aktivität des Enzyms im Myometrium von Kaninchen um das 10- bis 25fache. Der entsprechende Effekt läßt sich auch im Rattenuterus durchführen. Dabei werden die optimalen Bedingungen für die Induktion dieses Enzyms in Ratten ermittelt.

Weitere Untersuchungen sollen klären, ob dieses Enzym für Östradiol im Uterus spezifisch ist, und ob es sich um ein Enzym mit "Transhydrogenase-Funktion" zwischen Östradiol und Cortison handelt.

Anschließend wird diskutiert, ob der Korrelation zwischen Östradioloxydation und Cortisonmetabolisierung eine besondere physiologische Funktion bei der hormonalen Therapie zukommt.

B. EINLEITENDER ÜBERBLICK

Wird Ratten ^3H -Cortison i.p. injiziert, findet sich schon nach etwa 30 Minuten eine maximale Konzentration in der Leber. Der größte Teil des Hormons ist im Cytoplasma anzutreffen, doch dringt auch ein wesentlicher Teil davon in den Kern ein (Lit. 73). Von der im Kern vorhandenen Aktivität findet man einen Teil in Methanol-löslicher Form und einen Teil an Proteine gebunden (Lit. 74-76). Im Kern ist der größte Teil der Aktivität in Form der hormonell aktiven Corticosteroide (Cortisol und Cortison) anwesend, dagegen erfolgt im Cytoplasma eine schnelle Umwandlung zu inaktiven Metaboliten.

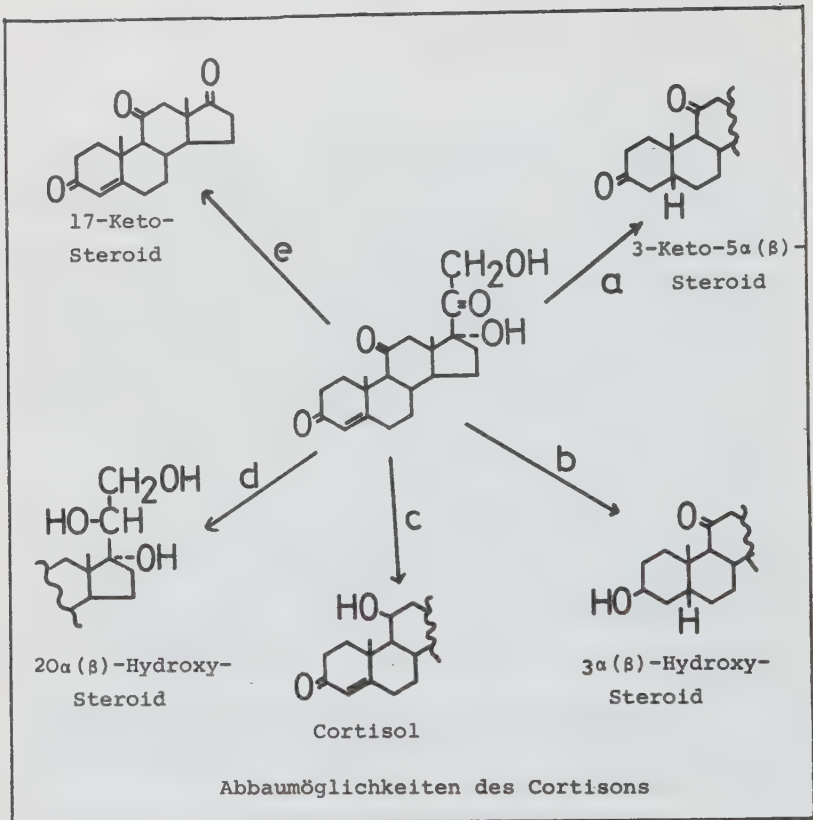
Gerade dieser Abbau ist eine Voraussetzung für die den Stoffwechsel und die Sexualfunktionen regulierenden Eigenschaften der Steroidhormone. Würden die Nebennierenrindenhormone nicht inaktiviert, so wirkten sie kumulativ und nicht regulierend auf den Stoffwechsel ein (Lit. 16).

Die Untersuchung des Stoffwechsels der Corticosteroide ist in vivo und in vitro ausführlich beschrieben worden (Lit. 77, 78-80).

Es ist bekannt, daß der Mechanismus zur Inaktivierung auf folgende enzymatische Reaktionen zurückzuführen ist (s. auch Abb. Seite 4):

- a) Reduktion an der 4-en-Bindung:
5 α - und 5 β -Pregnan (Lit. 82)
- b) Reduktion an der 3-Keto-gruppe:
3 α - und 3 β -Alkohole (Lit. 81, 83)
- c) Oxydoreduktionen am C-11-Atom:
Cortisol und Cortison (Lit. 84)
- d) Reduktion an der 20-Keto-gruppe:
20 α - und 20 β -Alkohole (Lit. 85)
- e) Oxydative Abspaltung der Seitenkette:
17-Keto-steroide (Lit. 86-88).

Die Umwandlungen wurden vor allem an Leber-, Nieren- (Lit. 19, 20) und Muskelpräparaten (Lit. 21) beobachtet.



Die Metabolitenbildung und ihre Verteilung im Körper wurde quantitativ hinreichend genau bestimmt (Lit. 89-90).

Die Steroid-umwandelnden Reaktionen werden durch Enzyme oder Enzymsysteme katalysiert, deren Substratspezifität sehr verschieden ist. Als Wasserstoff-übertragende Coenzyme dienen unter anderem NAD und NADP. Es kommen so in der Leber zwei 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen vor. Die eine ist NAD-, die andere NADP-abhängig (Lit. 68, 72). Beide Dehydrogenasen katalysieren die Oxydoreduktion am C-17-Atom eines Steroids. Diese Reaktion inaktiviert z.B. das Östradiol.

Die Aktivität der Enzyme ist species-, organ-

und geschlechtsabhängig (Lit. 5, 16, 18, 92). Die Lebermikrosomen-Reduktion der 20-Ketogruppe des Cortisons läuft bei weiblichen Ratten langsamer ab als bei männlichen (Lit. 16).

Ein schnell verlaufender enzymatischer Schritt bei der Inaktivierung des Cortisons stellt die Hydrierung der 4-en-3-on-gruppe dar, so daß überwiegend als Harnmetabolit Tetrahydrocortison ausgeschieden wird.

Die Glucuronisid- und Sulfatbildung der Steroide sind weitere Formen der Inaktivierung (Lit. 33, 49).

Ein anderes Kapitel sind neben dem Stoffwechsel die Wirkungsweise und der Steuermechanismus vom Östradiol und Cortison.

Das Regulationsprinzip der Nebennierenrindenhormone ist weitgehend ungeklärt, da sich die Wirkungsweise bisher nicht chemisch formulieren ließ. Erst in neuerer Zeit zeigen sich Ansätze, die dafür sprechen, daß die Nebennierenrindenhormone den Stoffwechsel als Enzyminduktoren oder -repressoren regulieren, d.h., daß sie die für die Glucogenese verantwortlichen Enzyme nicht direkt beeinflussen, sondern ihre Synthese auslösen (Lit. 94-95). Zuerst werden die Aminosäuren aktiviert und auf die lösliche RNS übertragen (Lit. 96). Dann bilden die Ribosomen aus diesen aktivierten Aminosäuren die Enzymproteine (Lit. 97). Die Information über die Struktur der Enzymproteine erhalten sie von den Genen des Zellkerns unter Vermittlung der für jedes Protein spezifischen m-RNS (Lit. 98).

Der Wirkungsmechanismus des Östradiols wurde mehrfach untersucht, um die Vielzahl physiologischer Östrogenwirkungen aufzuklären. Es besteht die Hypothese, daß die Transportvorgänge in Zellmembranen durch das Hormon beeinflußt werden, da eine rasche Wassereinlagerung und die Erhöhung der Glucose- und Aminosäurekonzentration im Uterus nach Vorbehandlung von Östradiol gefunden wurden (Lit. 50, 51, 59). Die Wirkung auf Ribonucleasen, Proteasen und Phosphatasen dagegen ist bekannt (Lit. 62, 100). Besonders wurden die Östrogenwirkungen auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels untersucht (Lit. 101-103). Nach Östrogenvorbehandlung wird z.B. vermehrt Ribose ge-

bildet. Ein anderer Effekt nach der Östradiolzufuhr ist die Stimulierung der Proteinbiosynthese, der eine Aktivierung der Ribonucleinsäure-Polymerasen und die Steigerung der Ribonucleinsäuresynthese vorausgeht (Lit. 63).

Als Primärreaktion der Hormonwirkung wird die spezifische Bindung von Östradiol im Uterus angenommen. Die Retentionsfähigkeit des Zielorgans gilt nur für Östradiol, nicht jedoch für Östron. Es erfolgt also kein Wasserstoffaustausch über den von Talalay und Williams-Ashman (Lit. 105) angenommenen Transhydrogenasemechanismus. Die Suche nach den Östrogenbindenden Faktoren blieb bisher erfolglos; die Funktionsweise des Östradiol-Rezeptorkomplexes ist noch nicht bekannt.

Dagegen ist der Steuermechanismus der Cortison- und Östradiol-Sekretion weitgehend geklärt.

Die Östrogenproduktion wird durch übergeordnete Hormone der Hypophyse stimuliert. Die geschlechtsunspezifischen Gonatropen, wie FSH, ICSH und LTH, kontrollieren das Geschehen in den Keimdrüsen und regieren hormonal den Menstruationscyclus. Gleichzeitig findet eine Rückkopplung der ausgeschütteten Östrogene auf die Produktion der Hypophyse statt.

Das wirksame Prinzip der Nebennierenrindenhormonsekretion ist das ACTH, das beim Menschen fast ausschließlich die Bildung von Cortisol und bei den Ratten vorwiegend die des Corticosterons stimuliert (Lit. 99). ACTH ist ein glandotropes Hormon, das auf die Nebenniere einwirkt und deren Hormonproduktion anregt, so daß vermehrt Corticosteroide in die Blutbahn gelangen. Ein erhöhter Corticosteroidspiegel selbst hat die Hemmung der Hypophysentätigkeit zur Folge. Dieser Rückkopplungsmechanismus wird heute durch zahlreiche, eingenommene Arzneimittel teils stimulierend, teils hemmend beeinflusst.

Ob auch ein zweites Steroidhormon, das auf Grund seiner unterschiedlichen Bildungsstätte und seines physiologischen Wirkungsmechanismus unabhängig von Cortison ist, in den intermediären Stoffwechsel eingreift, ist noch wenig untersucht worden. Erst in neuerer Zeit wurde be-

schrieben, daß der Redoxstatus eines Steroids durch die Anwesenheit eines zweiten, reduzierbaren beeinflusst werden kann. Die Experimente wurden mit Östradiol durchgeführt, das in 17 α -Stellung mit Tritium markiert worden ist. Wenzel und Pollow stellten so eine Reduktion von Androstendionen durch Östradiol-17 α -T fest (Lit. 1, 2). Das Tritium wurde unter Bildung von Östron auf reduzierbare Androgene übertragen. Dieser Tritium-Transfer in Mikrosomenfraktionen von Rattenlebern war nur unter Zugabe von Pyridinnucleotiden möglich. -

Diese enge Beziehung zwischen Oxydation und Reduktion beider Steroide wird in der vorliegenden Arbeit an Östradiol-17 α -T und Cortison überprüft. Die optimalen Bedingungen für den Tritium-Transfer werden aufgezeigt und der in vivo Nachweis für die Reaktion erbracht.

Anschließend wird über die Bedeutung dieser spezifischen Wasserstoff-Übertragung zwischen den Steroiden diskutiert.

C. ERGEBNISSE

C. 1. Die Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison in Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten

C.1.1. Stoffwechsel von Cortison und Identifizierung der Metabolite

Identifizierung von 20 α -Hydroxycortison

Werden Leberschnitte weiblicher Ratten mit Östradiol-17 α -T inkubiert, so zeigt sich nach Dünnschichtchromatographie des Extraktes dieses Ansatzes nur ein einziges radioaktives Maximum: nämlich das vom nicht verstoffwechselten Östradiol. Wird den Inkubationsansätzen aber Cortison als Wasserstoff-Akzeptor beigegeben, treten weitere radioaktive Maxima auf (Abb. 1).

Zur Identifizierung der aus Östradiol-17 α -T und Cortison neu gebildeten, radioaktiven Verbindung (20 α -Co, R_f = 0,27) wurde das entsprechende Maximum im System 2 und 3 (s. Methodik) durch Rechromatographie gereinigt. Zur Charakterisierung wurde die UV-absorbierende Substanz mit authentischem 20 α -Hydroxycortison (= 4-Pregnen-17 α ,20 α ,21-triol-3,11-dion) umkristallisiert, acetyliert und das Acetatgemisch dünnschichtchromatographisch getrennt. Die R_f -Werte im System 1 und 2 waren identisch mit dem 20 α -Hydroxycortison-20,21-diacetat (s. Tabelle 1).

Um den Ort des Tritiumeinbaues im Metaboliten zu lokalisieren, wurde ein aus Östradiol-17 α -T und ¹⁴C-markiertem Cortison hergestelltes Reduktionsprodukt mit Chromtrioxyd und Schwefelsäure oxydiert. Nach Abtrennung der organischen Phase der Oxydationslösung wurden 98% der Tritium-Aktivität in der wäßrigen Phase wiedergefunden. Das Tritium, das der Reduktion von Ketogruppen dient, spaltete

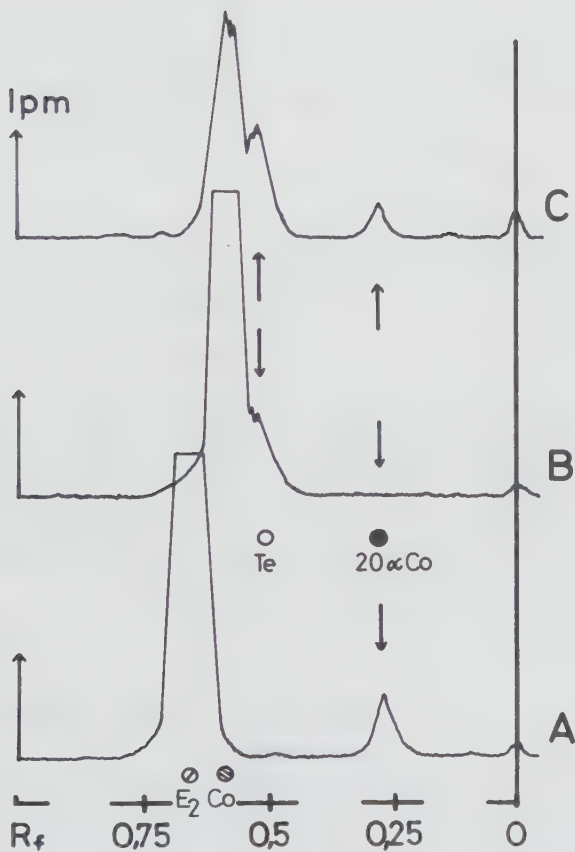


Abb.1 : Radio-Dünnschichtchromatogramm der Metabolite von Cortison und Östradiol nach Inkubation mit weiblichen Rattenleberschnitten

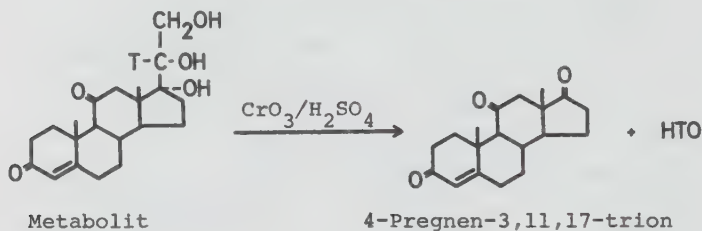
C Inkubationsansatz mit 4-¹⁴C-Cortison (0,5 µMol/l) mit inaktiven Östradiol (100 µMol/l)

B Kontrollversuch mit 4-¹⁴C-Cortison (0,5 µMol/l)

A Inkubationsansatz mit Östradiol-17α-T (0,32 µMol/l) mit Zusatz von inaktiven Cortison (100 µMol/l)

Einzelheiten der Bedingungen siehe Methodik

sich bei der Oxydation als Tritium-markiertes Oxydationswasser (HTO) ab. Der Rückstand der organischen Phase (Methylenchlorid-Extrakt) ist identisch mit der Substanz, die unter den gleichen Oxydationsbedingungen mit 20 α -Hydroxycortison entsteht (nach Bush und Sandberg (Lit. 13):



Da eine dünn-schichtchromatographische Trennung von 20 α - und 20 β -Hydroxycortison nicht einwandfrei möglich ist, wurde zur weiteren Identifizierung nach den Angaben von Henning und Zander (Lit. 14) verfahren. Abbildung 2 zeigt, daß durch NAD und 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase der Metabolit nicht zu Cortison oxydiert wird.

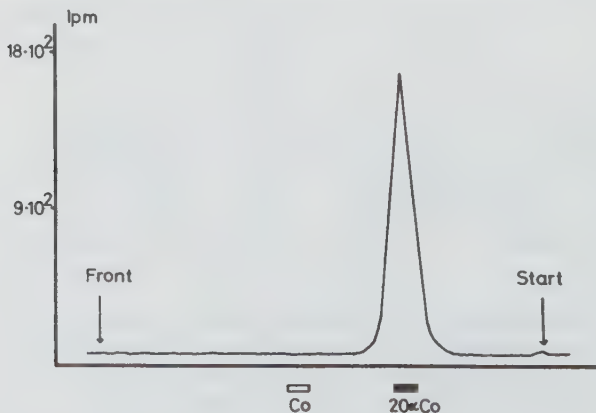


Abb. 2 : Radiochromatogramm des Metaboliten nach der Oxydation mit NAD und 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Fließsystem 1.

Die fragliche Tritium-markierte Verbindung mit dem Rf-Wert von 0,27 ist - wie diese Versuche zeigen - mit 20 α -Hydroxycortison identisch. Cortison wird also durch Östradiol-17 α -T am C-20-Atom reduziert.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Identifizierung zeigt Tabelle 1.

Ein weiteres radioaktives Reduktionsprodukt des Cortisons (Rf = 0,10, Abb. 1), das nahe am Start gelegen ist, konnte als Cortolon gedeutet werden. Die sterische Anordnung der bei der Reduktion von Ring A erhaltenen H-Atome wurde nicht untersucht. Die kleinen Mengen der an der Startlinie verbliebenen "hochpolaren" Metabolite blieben unbeachtet.

Nach Aufarbeitung solcher in vitro Versuche wurden ca. 85-90% der eingesetzten Aktivität wiedergefunden. Die neuen Aktivitätsgipfel nach einer Inkubation von 40 μ Ci = 3,2 μ Mol/l Östradiol-17 α -T mit 200 μ Mol/l Cortison bestätigten die Vermutung, daß noch weitere radioaktive Cortisonmetabolite entstehen. Diese Maxima wurden nicht bei den weiteren Untersuchungen berücksichtigt, da sie weniger als 1% der eingesetzten Radioaktivität besaßen.

Stoffwechsel von 20 α -Hydroxycortison

Um den Stoffwechsel des Cortisons kennenzulernen, wurden Leberschnitte weiblicher Ratten mit ¹⁴C-markiertem Cortison inkubiert. Wie aus Abbildung 1B ersichtlich, entstehen aus 4-¹⁴C-Cortison zwei radioaktive Maxima: einen Rest an Cortison (Co) und das Tetrahydrocortison (Te).

Eine bessere Trennung dieser Steroide liefert das Laufmittel 2 (Lit. 15).

Im fraglichen Rf-Bereich des 20 α -Hydroxycortisons ist kein radioaktiv markierter Substanzgipfel nachweisbar. Er wird jedoch durch Zugabe von 100 μ Mol/l inaktivem Östradiol sichtbar (Abb. 1C). Dies beweist wiederum, daß Östradiol-17 α -T den zur Reduktion von Cortison benötigten Wasserstoff liefert.

In den Leberschnitten wird zum größten Teil Tritium-markiertes 20 α -Hydroxycortison und nur in sehr

Tabelle 1 : Identifizierung von Tritium-markiertem

4-Pregnen-17 α ,20 α ,21-triol-3,11-dion

Die Substanz entstand bei Inkubation von Cortison mit Östradiol-17 α -T in weiblicher und männlicher Rattenleber

Maßnahme zur Identifizierung	Ergebnisse	
	inaktiv Referenzsubst.	radioaktiv
1. Dünnschichtchromatographie in Laufmittel 1	<u>Rf-Werte</u>	
	0,27	0,27
2. Rechromatographie des peaks von 1 in System 2	0,33	0,33
3. Rechromatographie des peaks von 2 in System 3	0,49	0,49
4. Elution der radioaktiven Maxima mit Aceton, Mikro- acetylierung, dann DC der Acetate in System 1	0,55	0,56
5. Rechromatographie des peaks von 4 in System 2	0,63	0,63
6. ¹⁴ C- und T-markierter Me- tabolit (Rf = 0,27) wird oxydiert durch 1 Tropfen der Lösung von 25g CrO ₃ und 25 ml konz. Schwefel- säure ad 100 ml Wasser. Die abgetrennte, einge- dampfte org. Phase wird auf eine DC-Platte aufgetragen. Laufmittelsystem 1	98% der Tritium-Aktivität wurde in der wäßrigen Phase der Oxydationslö- sung wiedergefunden. Rf-Wert der ¹⁴ C-markierten Substanz ist identisch mit der Substanz, die unter gleichen Oxydationsbedin- gungen mit 20 α -Hydroxycor- tison entsteht. <u>Beweis:</u> 20 α -Hydroxycortison	

geringem Teil Cortolon gebildet. Diese spezifische Tritium-Reduktion der 20-Ketogruppe des Cortisons beweist auch der Versuch, bei dem den Leberhomogenatansätzen weiblicher Ratten statt Cortison 20-Hydroxycortison als Tritium-Akzeptor zugesetzt wurde (Abb. 3). Es findet also keine vermehrte Reduktion am Ring A statt.

Vermutlich stehen die Redoxpaare

Östradiol - Östron und

Cortison - 20 α -Hydroxycortison

in wechselseitiger Beziehung, und möglicherweise reduziert das vom Östradiol-17 α -T stammende Tritium bevorzugt die 20-Ketogruppe.

Die Abbildung 4 gibt den zeitlichen Verlauf des Cortisonabbaues im Homogenat weiblicher Rattenleber wieder. Etwa die Hälfte des eingesetzten Cortisons ist nach 15 Minuten metabolisiert. Ein Zusatz der 20fachen Menge inaktiven Östradiols beschleunigt den Abbau. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß das Östradiol die Reduktion des Nebennierenrindenhormons spezifisch beeinflusst.

C.1.2. Einfluß der verschiedenen Parameter auf den Wasserstoff-Transfer

Bei enzymatischen Reaktionen bestimmen neben den Substratkonzentrationen die Wasserstoffionenkonzentration, die Inkubationszeit und die Temperatur die Umsatzgeschwindigkeit. Um die optimalen Bedingungen einer Wasserstoff-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison zu ermitteln, wurden die Abhängigkeiten der Wasserstoff-Übertragung:

- a) von der Wasserstoffionenkonzentration,
- b) von der Inkubationstemperatur und
- c) von der Inkubationszeit untersucht.

Spezifität des T-Transfers

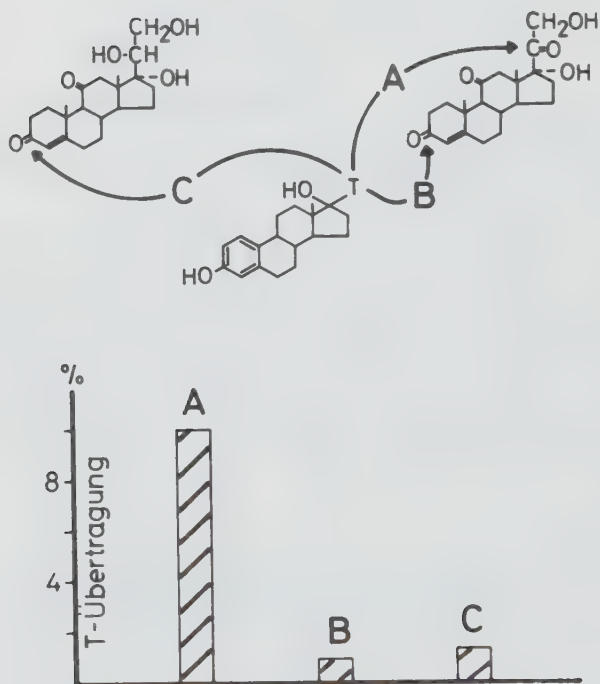


Abb.3 : Spezifität der Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Cortison und 4-Pregnen-17α,20,21-triol-3,11-dion

Ansätze: Je 100 mg Leberschnitte weibl. Ratten wurden in 4,0 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, homogenisiert und bei 37°C 5 Minuten inkubiert.

Östradiol-17α-T: 0,32 µMol/l

Cortison: 100 µMol/l

20-Hydroxycortison: 100 µMol/l

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität

n = 4.

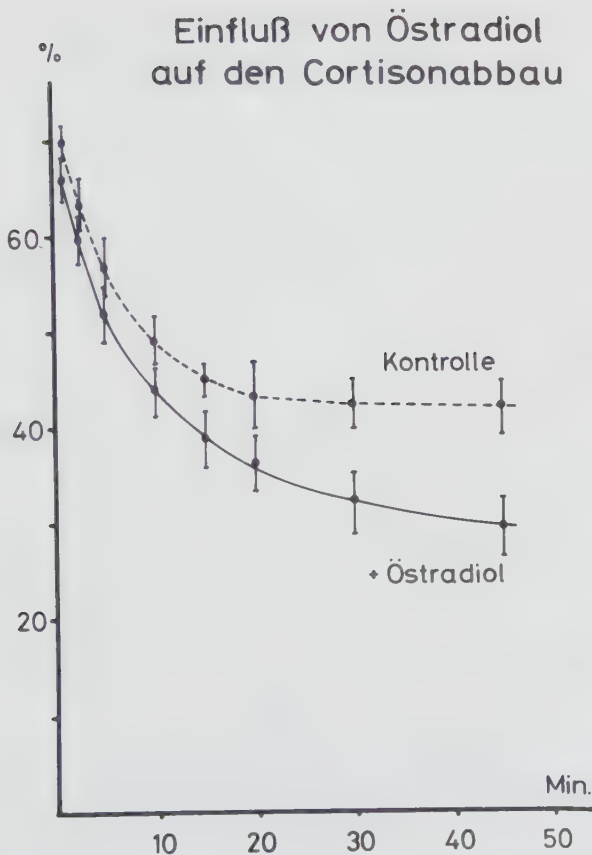


Abb.4 : Zeitabhängigkeit des Cortisonabbaues in weiblichen Rattenleber mit und ohne Zusatz von Östradiol

Inkubationsansätze: 100 mg Leber einer weiblichen Ratte werden in 4 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,3, homogenisiert und der Anteil an unverändertem Cortison zu verschiedenen Zeiten gemessen.

$4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cortison: 0,055 μCi = 0,18 $\mu\text{Mol/l}$

Östradiol: 3,5 $\mu\text{Mol/l}$

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität

n = 2

p = 0,001 t = 30 und 45 Min.

a) Abbildung 5 zeigt den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration im pH-Bereich 5,5 bis 10,2. Das Maximum der 20-Keto-Reduktion von Cortison durch Östradiol liegt bei pH 7,3. Der Abbau des Östradiol-17 α -T zu HTO und Östron wurde an Hand des zurückgebliebenen Östradiols gemessen. Der größte Substratumsatz liegt auch hier bei pH 7,3; ebenso das Maximum der HTO-Bildung, welches ebenfalls als ein Maß für die Östradioloxydation angesehen werden kann. Die angegebenen Prozentzahlen wurden nicht korrigiert. Sie beziehen sich auf die eingesetzte Aktivität von Östradiol-17 α -T, von der 85-90% wiedergefunden wurde.

b) Werden Inkubationen von Östradiol-17 α -T und Cortison in Leberschnitten weiblicher Ratten in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur durchgeführt, so zeigt sich zwischen 20°C und 37°C ein kontinuierlicher Anstieg der Bildung von 20 α -Hydroxycortison-20 β -T und ein Abfall nach Erreichen des Maximums. Der Reaktionsumsatz des Östradiols, gemessen an der HTO-Ausbeute, weist einen analogen Verlauf auf. Der Östradiol-rest, der HTO-Umsatz und die Bildung von 20 α -Hydroxycortison-20 β -T haben einen gemeinsamen Scheitelpunkt (37°C).

c) Nach Angaben von Wenzel und Mützel (Lit. 4) steigt bei zunehmender Inkubationsdauer die Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf 5 α -Androsten(3)-on(17) bis zum Gleichgewicht an. Die hier durchgeführten Versuche mit den Ansätzen weiblicher Leberschnitte zeigen jedoch, daß das Maximum der Metabolitenbildung schon nach 5 Minuten erreicht wird, und dann nach 45 Minuten bis auf etwa 3% der eingesetzten Aktivität abfällt (Abb. 7b). Im Leberhomogenat weiblicher Ratten stellt sich sogar schon nach 2-3 Minuten das Gleichgewicht ein (Abb. 7a).

Außerdem läßt sich aus den Abbildungen ersehen, daß mit zunehmender Inkubationsdauer Östradiol verstärkt zu Östron und HTO oxydiert wird. Vermutlich nimmt bei längerer Inkubation die Konzentration des intakten Cortisonmoleküls in der Leber so stark ab, daß bei der Östradioloxydation das abgespaltene Tritium über immer

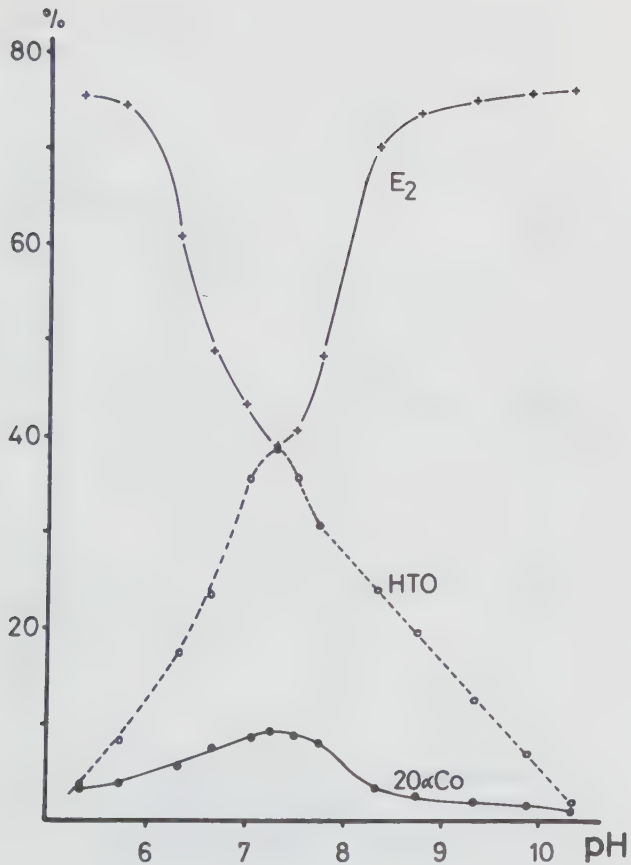


Abb.5 : Tritumeinbau aus Östradiol-17 α -T (E₂) in HTO und 20 α -Hydroxycortison-20 β -T (20 α Co) bei Inkubation von Leberschnitten weiblicher Ratten in Abhängigkeit von der pH-Konzentration

Die Ansätze enthielten 0,32 μ Mol/l Östradiol-17 α -T und 100 μ Mol/l Cortison in einem Endvolumen von 4,2 ml. 100 mg Leber wurden jeweils in 4 ml Puffer bei 37° C 5 Minuten inkubiert.

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität
n = 2.

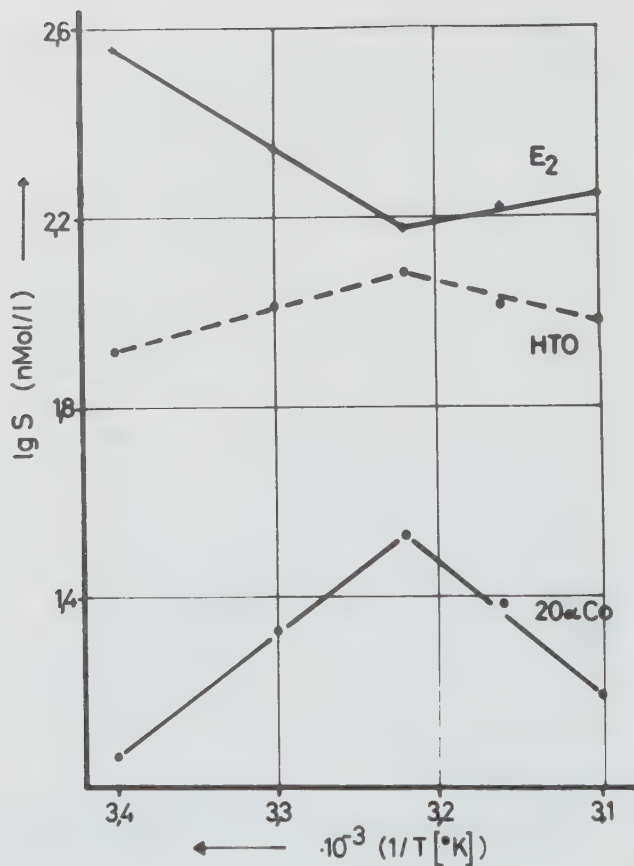


Abb.6 : Tritiumeinbau aus Östradiol-17 α -T (E_2) in HTO und 20 α -Hydroxycortison-20 β -T bei Inkubation in Leberschnitten weiblicher Ratten, in Abhängigkeit von der Inkubations-temperatur.

Die Ansätze enthielten 0,35 μ Mol/l Östradiol-17 α -T und 100 μ Mol/l Cortison in einem Endvolumen von 4,2 ml. 100 mg Leber wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 5 Minuten inkubiert.

n = 2.

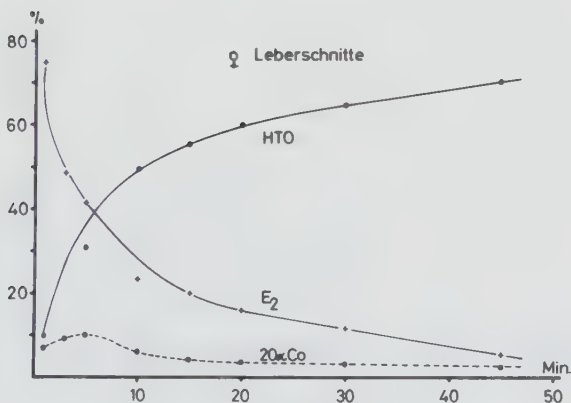
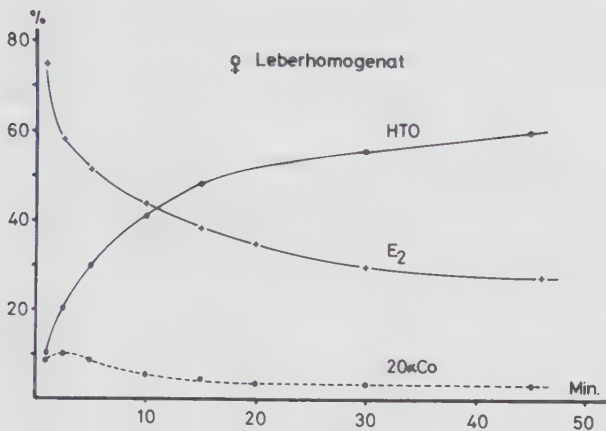


Abb.7a : Tritiumeinbau aus Östradiol-17 α -T (E₂) in HTO und 20 α -Hydroxycortison-20 β -T (20 α Co) bei Inkubation in Homogenat von Leber weiblicher Ratten, zu verschiedenen Zeiten gemessen.

Die Ansätze enthielten 0,35 μ Mol/l Östradiol-17 α -T und 100 μ Mol/l Cortison in einem Endvolumen von 4,2 ml. 100 mg Leber wurden in 4 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, homogenisiert. Inkubationstemperatur 37 $^{\circ}$ C. Ordinate: % der eingesetzten Aktivität

Abb.7b : Analoger Ansatz wie oben, statt Homogenat wurden Leberschnitte eingesetzt.
n = 2.

weniger Cortisonmoleküle zur Reduktion verfügt. Wie später gezeigt wird, führt eine abnehmende Konzentration von Cortison, in Gegenwart einer konstanten Menge Östradiol, zu einer stark verminderten Bildung von 20 α -Hydroxycortison.

Welchen Einfluß hat der Cortisonabbau (s. auch Abb. 4) auf die Bildung von 20 α -Hydroxycortison durch Östradiol-17 α -T bei zunehmender Inkubationsdauer?

Zur Prüfung dieser Beziehung wurde ¹⁴C-markiertes Cortison mit bekannter molspezifischer Aktivität mit Östradiol-17 α -T inkubiert und die Ausbeute und spezifische Aktivität des doppelt markierten 20 α -Hydroxycortisons in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. In Abbildung 8 wurden die spezifischen Aktivitäten des mit Tritium-markierten 4-¹⁴C-20 α -Hydroxycortison der Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf inaktives Cortison gegenübergestellt. Das nach gleicher Zeit auftretende Inkubationsmaximum (5 Minuten), sowie der gleiche Kurvenverlauf bestätigen die oben genannte Vermutung, wonach mit zunehmender Inkubationsdauer die Östradioloxydation schneller erfolgt als die Tritium-Übertragung auf Cortison. Da die relative spezifische Aktivität nur vom Verhältnis Donator- zu Akzeptorkonzentration abhängt (s. Abb. 13), muß mit fortschreitender Inkubation die Östradiol-Konzentration kleiner werden, wenn auch die relative spezifische Aktivität des 20 α -Hydroxycortisons abnehmen soll und man voraussetzt, daß die Cortison-Konzentration konstant bleibt. Da aber nach den Versuchen von Seite 15 die Cortison-Konzentration ebenfalls absinkt (was die geringe Ausbeute an Tritium-markiertem 20 α -Hydroxycortison erklärt), muß die Östradioloxydation schneller ablaufen als die Cortisonreduktion durch Östradiol-17 α -T.

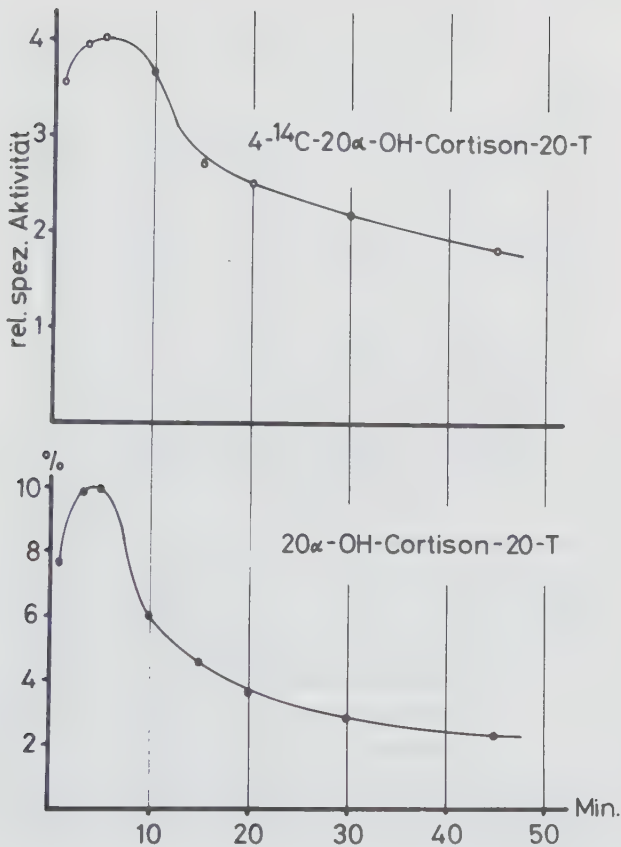


Abb.8 : Vergleich des einfach und doppelt markierten 4-Pregnen- $17\alpha, 20\alpha, 21$ -triol-3,11-dion

Ordinate oben: rel. spez. Aktivität des Metaboliten

unten: % Metabolit der eingesetzten Aktivität Östradiol- $17\alpha\text{-T}$

Inkubationsansätze: 100 mg Leberschnitte wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, bei 37°C inkubiert.

Östradiol- $17\alpha\text{-T}$: 0,35 $\mu\text{Mol/l}$

Cortison bzw. $4\text{-}^{14}\text{C}\text{-Cortison}$: 100 $\mu\text{Mol/l}$

n = 2.

C.1.3. Sexualspezifität

Die geschlechtsspezifischen Unterschiede im Leberhomogenat und in Schnitten sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Sowohl die HTO- und Metabolitenbildung, als auch das nicht verstoffwechselte Östradiol-17 α -T wurden nach 1, 5, 15 und 30 Minuten gemessen. Die Zahlenangaben wurden auf 100% der wiedergefundenen Aktivität bezogen, da die Ausbeute dieser Versuchsreihe zwischen 70 und 90% lag und der Bezug auf diese den Aussagewert verzerren würde (Lit. 34).

Es zeigt sich bei der Tritium-Übertragung auf das Akzeptormolekül Cortison, daß die Gleichgewichtseinstellung bei weiblichen und männlichen Ratten nach verschiedenen Zeiten erreicht wird. Im Leberhomogenat und in Schnitten weiblicher Ratten tritt schon nach 5 Minuten die maximale Metabolisierung des Cortisons ein. Nach 30 Minuten ist die Tritium-Einbaurrate auf ein Drittel abgesunken. Dagegen ist im Homogenat männlicher Tiere erst nach 15 Minuten die Reduktion der 20-Ketogruppe des Cortisons optimal.

Der Geschlechtsunterschied findet seinen Ausdruck in der unterschiedlichen Reduktionsrate von Cortison durch Östradiol-17 α -T nach 30minütiger Inkubationsdauer, da in männlichen Ratten mehr als die doppelte Menge an 20 α -Hydroxycortison-20 β -T als in weiblichen Tieren wiedergefunden wurde.

Das Ausmaß der Tritium-Übertragung ist in Leberhomogenat und -schnitten beider Geschlechter annähernd gleich groß.

Erstaunlicherweise gibt es zwischen Östradiol-oxydation und Cortisonreduktion keine Parallelität. Bei weiblichen Ratten ist die Stoffwechselleistung in der Leber, bezogen auf die HTO-Bildung, höher als bei männlichen Tieren. Rattenmännchen setzen pro Zeiteinheit also etwas weniger Östradiol um als Rattenweibchen, eine Tatsache, die im Gegensatz zu den Arbeiten von Wenzel und Mützel steht (Lit. 4).

Inkubations- zeit (Min.)	% der eingesetzten Aktivität				
	Homogenat		Schnitte		in :
	♀	♂	♀	♂	
1	81,4	50,6	80,8	78,8	Östradiol-17 α -T
	8,6	3,0	7,9	3,8	Metabolit
	10,0	46,4	11,3	17,4	HTO
5	56,4	46,6	49,5	49,7	Östradiol-17 α -T
	9,8	7,5	11,5	7,6	Metabolit
	33,8	45,9	39,0	42,7	HTO
15	42,3	39,7	25,6	44,5	Östradiol-17 α -T
	5,4	11,9	5,6	11,3	Metabolit
	52,3	48,4	68,8	44,2	HTO
30	34,0	38,8	24,8	43,0	Östradiol-17 α -T
	3,8	10,0	3,1	8,3	Metabolit
	62,2	51,1	72,1	48,7	HTO

Tabelle 2: Tritium-Einbau aus Östradiol-17 α -T in HTO und 4-Pregnen-17 α ,20 α ,21-triol-3,11-dion-20-T bei Inkubation von Cortison mit Rattenleber männlicher und weiblicher Tiere.

Inkubationsansätze: 100 mg Leberhomogenat bzw. -schnitte wurden bei 37° C und pH 7,3 1, 5, 15 und 30 Minuten inkubiert.

Östradiol-17 α -T: 0,32 μ Mol/l

Cortison: 100 μ Mol/l

Endvolumen: 4,2 ml

Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen und wurden auf 100% Ausbeute korregiert.

C.1.4. Der Einfluß der Steroidkonzentrationen
auf die Tritium-Übertragung

Alle bisherigen Untersuchungen zur Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison wurden bei konstanten Steroidkonzentrationen durchgeführt. Nach Arbeiten von Wenzel et al. (Lit. 4) wird der Tritium-Transfer von Steroid zu Steroid besonders deutlich, wenn man die Konzentrationen des Akzeptors bzw. des Donators ändert. Die anschließenden Untersuchungen zeigen den Einfluß der Steroidkonzentrationen auf die Tritium-Übertragung.

Abbildung 9 gibt den Einfluß der Östradiol-Konzentration auf den Tritiumeinbau in 20 α -Hydroxycortison und HTO und den Östradiol-17 α -T-Umsatz in Leber weiblicher Ratten wieder. Je geringer die Konzentration des Donators, desto größer ist der prozentuale Tritiumeinbau in den Akzeptor-Metaboliten und desto größer ist aber auch die prozentuale HTO-Bildung. In physiologischen Bereichen (0,1 μ Mol/l) wird das Tritium aus dem Östradiol-17 α -T zu 50% in HTO und zu 15% in 20 α -Hydroxycortison-20 β -T eingebaut. Bei zunehmender Donatorkonzentration nimmt der prozentuale Einbau in Tritium-markiertes 20 α -Hydroxycortison rasch ab, so daß bei einer Konzentration von 5 μ Mol/l Östradiol-17 α -T nur noch jedes hundertste Molekül zur Reduktion von Cortison verwendet wird. Da auch gleichzeitig die HTO-Ausbeute absinkt, ist zu vermuten, daß die Stoffwechselaktivität des übertragenden Enzyms durch hohe Dosen von Östradiol gehemmt wird, und daß nur bei sehr geringer Konzentration des Östradiols zwischen Östradiol-17 α -T und Cortison wechselseitige oxydo-reduktive Beziehungen bestehen.

Um den Einfluß der Akzeptorkonzentration auf die Tritium-Übertragung bei konstanter Donatormenge zu verdeutlichen, wurde Leberhomogenat weiblicher Ratten mit Östradiol-17 α -T und steigenden Mengen Cortison inkubiert. Bis zu einer Konzentration von 200 μ Mol/l Cortison ist der Tritium-Transfer besonders deutlich zu erkennen

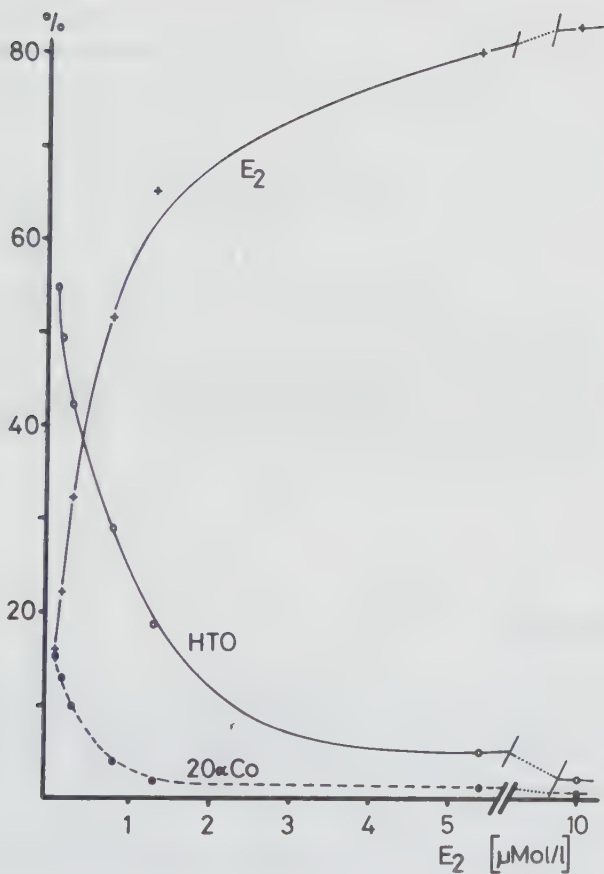


Abb.9 : Abhängigkeit des Tritiumeinbaues in HTO und 20α -Hydroxycortison- 20β -T ($20\alpha\text{Co}$) von der Östradiol-Konzentration

Ansätze: 100 mg Leber weiblicher Ratten wurden in 4,0 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, homogenisiert und mit 100 $\mu\text{Mol/l}$ Cortison 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität
 $n = 2$.

(Abb. 10a). In diesem Bereich wird das vom Östradiol-17 α -T stammende Tritium verstärkt zur Reduktion von Cortison verbraucht. Erhöht man die Konzentration an Nebennierenrinden-hormonen weiter (bei konstanter Östradiolkonzentration), so nimmt die Bildung von 20 α -Hydroxycortison-20 β -T nur geringfügig zu.

Aus beiden Abbildungen läßt sich entnehmen, daß der Einfluß des Cortisons auf die Östradioloxydation im engen Zusammenhang mit der unspezifischen HTO-Bildung steht.

Wird die Beziehung zwischen der Konzentration an Cortison und der Ausbeute an 20 α -Hydroxycortison-20 β -T nach Lineweaver-Burk in die Beziehung $1/v$ und $1/S$ transformiert, ergibt sich die Michaelis-Menten-Konstante für Cortison $K_m = 2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l bei der Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison (Abb. 10b).

Gewebespezifität

In den bisher durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, daß in der Leber männlicher und weiblicher Ratten ein Enzym oder ein Enzymsystem vorhanden ist, das unter Verwendung des vom Östradiol-17 α -T abgespaltenen Tritiums Cortison reduziert.

Als Maß einer Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison gibt es zwei Messgrößen:

1. die relative Tritium-Ausbeute im Tritium-markierten Cortison-metaboliten, bezogen auf die eingesetzte Gesamtaktivität an Östradiol-17 α -T, und
2. die spezifische Aktivität des Tritium-markierten 20 α -Hydroxycortisons. Die spezifische Aktivität gibt Aufschluß über den vom Östradiol-17 α -T stammenden Anteil der Reduktionsäquivalente im Verhältnis zur Gesamtreaktion.

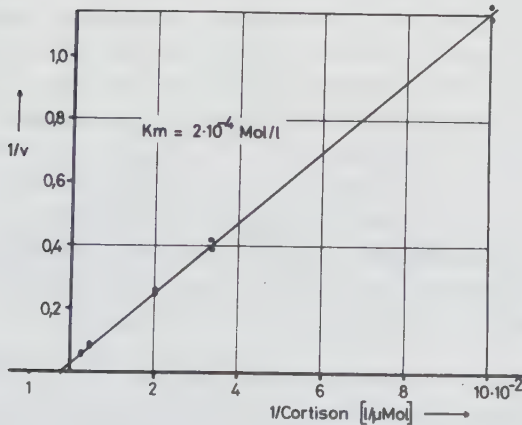
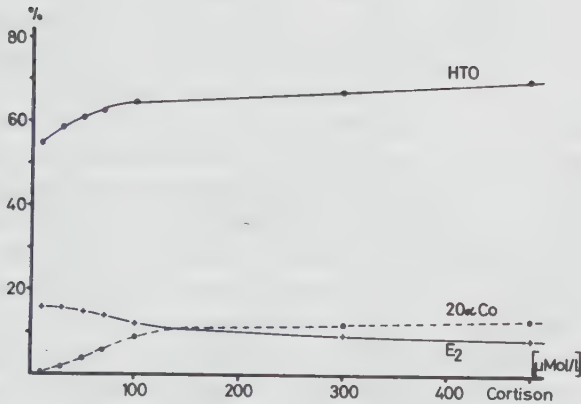


Abb. 10a : Abhängigkeit des Tritiumeinbaues in HTO und 20α-Hydroxycortison-20β-T (20αCo) von der Cortisonkonzentration

Ansätze: 100 mg Leber einer weiblichen Ratte wurden in 4,0 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, homogenisiert und mit 0,35 μMol/l Östradiol-17α-T 5 Min. bei 37° C inkubiert. Ordinate: % der eingesetzten Aktivität

Abb. 10b : Bestimmung des Km-Wertes nach Lineweaver-Burk für Cortison

(Werte aus Abb. 10a übertragen).

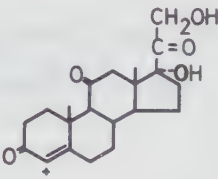
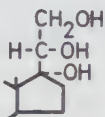
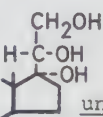
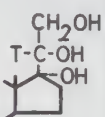
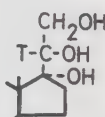
n = 2.

Zur quantitativen Bestimmung der Reduktionsprodukte wurde ^{14}C -markiertes Cortison mit Östradiol-17 α -T inkubiert. Nach Isolation und Rechromatographie des doppelt markierten Produktes wurde aus dem ^{14}C -Gehalt mit Hilfe der spezifischen Aktivität des eingesetzten ^{14}C -Cortisons die entstandene 20 α -Hydroxycortisonmenge in μMol berechnet. Der Quotient aus der eingebauten Tritiummenge pro μMol ^{14}C -Verbindung lieferte die spezifische Aktivität des 4- ^{14}C -20 α -Hydroxycortison-20 β -T. Das Verhältnis der spezifischen Aktivität von Östradiol-17 α -T zur spezifischen Aktivität des 20 α -Hydroxycortison-20 β -T ergibt die relative spezifische Aktivität, die in Prozent angegeben wird. Definitionsgemäß wird die spezifische Aktivität des Östradiol-17 α -T mit 100% angesetzt.

Die so ermittelten Zahlen geben also das Verhältnis der durch Tritium reduzierten Cortisonmenge zur Gesamtreaktion wieder. Wird das Nebennierenrindenhormon nur durch die Tritium-ionen des Östradiols reduziert, so erreicht der Zahlenwert 100. Falls das ^{14}C -Cortison ausschließlich durch den Wasserstoff anderer Donatoren der Zelle und nicht durch das vom Östradiol-17 α -T stammende Tritium hydriert würde, enthielte das ^{14}C -markierte Reduktionsprodukt kein Tritium und seine relative spezifische Aktivität betrüge 0 (siehe Schema nächste Seite).

Die weiteren Experimente sollten mit Hilfe der Doppelmarkierung die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des Tritium-markierten Reduktionsproduktes von der Donator- und Akzeptorkonzentration in männlichen und weiblichen Leberschnitten nachweisen.

Bei zunehmender Donatorkonzentration steigt die relative spezifische Aktivität des doppeltmarkierten 20 α -Hydroxycortison (Abb. 11). Auffällig ist der hohe Tritium-Anteil an der Gesamtreaktion im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-6} Mol/l Östradiol-17 α -T. Bei Leberschnitten weiblicher Ratten stammen fast 90% der zur Reduktion von Cortison benötigten Wasserstoffatome vom Östradiol-17 α -T, bei

AKZEPTOR ^{14}C -markiert			
DONATOR	1. Durch unmarkierte Substrate wird <u>nur mit H</u> reduziert	2. Durch unmarkierte und markierte Substrate wird <u>mit H und mit T</u> reduziert	3. Durch Östradiol-17 α -T <u>nur mit T</u> reduziert
METABOLIT ^{14}C -markiert	<u>nur:</u> 	 <u>und</u> 	<u>nur:</u> 
SPEZIFISCHE T-AKTIVITÄT			
absolut ⁺ ($\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$)	0	6	60
relativ ⁺⁺ (%)	0%	10%	100%
⁺ Als Beispiel für ein T-markiertes Substrat als Donator dient Östradiol-17 α -T mit der spezifischen Aktivität von 60 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$. ⁺⁺ Spezifische Aktivität von Östradiol-17 α -T = 100%			
Schema in Analogie zu Lit. 4			

männlichen etwa 70%. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit männlichen und weiblichen Ratten, unter gleichen Bedingungen gewonnen, lassen einen direkten Vergleich der Einbau-raten für Tritium in Cortison zu.

Ferner wurden Inkubationsversuche mit konstanter Donatorkonzentration (0,5 $\mu\text{Mol/l}$) durchgeführt. Die Cor-tison-Konzentration aber variierte zwischen 10^{-8} und 10^{-5} Mol/l.

In analoger Weise wurde die spezifische Aktivität des gebildeten 4- ^{14}C -20 α -Hydroxycortison-20 β -T be-

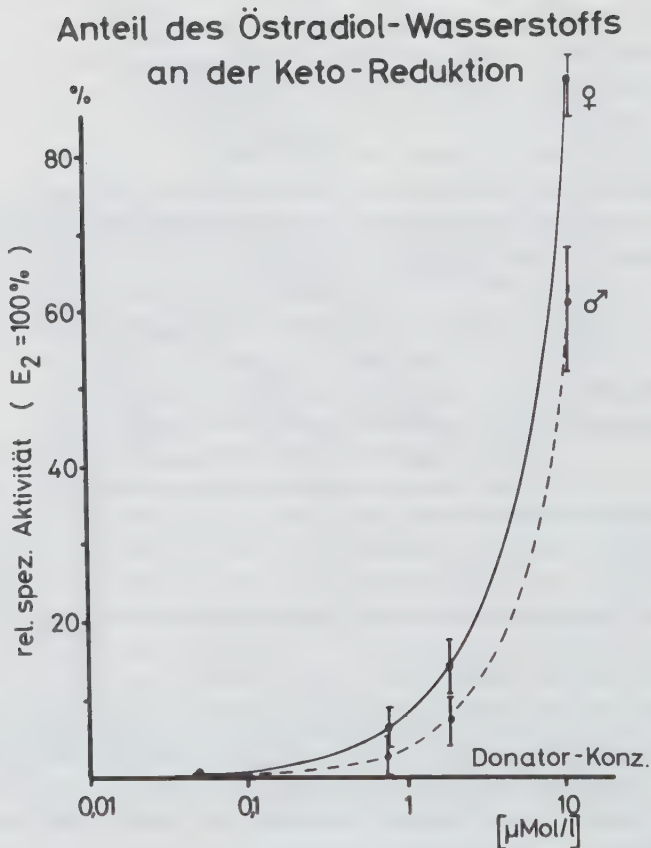


Abb. 11 : Relative spezifische Aktivität des mit Tritium markierten 4-¹⁴C-20 α -Hydroxycortison bei der Inkubation mit Östradiol-17 α -T in Leberschnitten weiblicher und männlicher Ratten bei Anwesenheit von Cortison in Abhängigkeit von der Östradiolkonzentration.

Ansätze: 100 mg Leber wurden in 4,0 ml Ringger-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

Cortison-4-¹⁴C: 0,175 µMol/l

n = 2.

stimmt. Diese wurde zur spezifischen Aktivität des Östradiol-17 α -T (= 100%) in Relation gesetzt.

Bei zunehmender Cortison-Konzentration wird das vom Östradiol-17 α -T stammende Tritium bei der Reduktion immer mehr von Wasserstoff anderer konkurrierender Donatoren der Zelle substituiert (Abb. 12). Die relative spezifische Aktivität sinkt. Dagegen steigt bei abnehmender Konzentration des Akzeptors der relative Tritium-Anteil im Cortisonmetaboliten. In diesem Bereich ist wiederum der Effekt bei Weibchen stärker ausgeprägt als bei Männchen.

Da bei den Konzentrationsabhängigkeiten entweder Donator- oder Akzeptorkonzentration konstant gehalten wurde, ist zu vermuten, daß die Tritium-Übertragung stets nur vom Verhältnis

Donator : Akzeptor

abhängt (die Bezeichnung dieser Verhältniszahl wird in dieser Arbeit mit Q benannt).

Ist ein Überschuß von Cortison im Verhältnis zum Östradiol-17 α -T vorhanden, fällt die relative spezifische Aktivität des 20 α -Hydroxycortison-20 β -T stark ab, da die zur Reduktion benötigten Tritium-hydridionen durch Wasserstoff anderer Donatoren der Zelle stark verdünnt werden. Der Tritium-Anteil im Reduktionsprodukt ist jedoch verhältnismäßig hoch, weil die hohe Cortison-Konzentration einen großen Bedarf an Reduktionsäquivalenten hat. Je kleiner der Quotient Donator zu Akzeptor wird, desto mehr nimmt die spezifische Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) ab. Übersteigt die Konzentration des Donators die des Akzeptors (Q größer als 1), muß wegen des hohen Tritium-Angebots die relative spezifische Aktivität des gebildeten 20 α -Hydroxycortison-20 β -T steigen. So wird beispielsweise bei einer Östradiol-Konzentration von 0,5 $\mu\text{Mol/l}$ und einer Cortison-Konzentration von 0,1 $\mu\text{Mol/l}$ das gebildete 4-¹⁴C-20 α -Hydroxycortison-20 β -T bei Weibchen zu 15% und bei Männchen zu 5% durch das vom Östradiol-17 α -T stammende Tritium reduziert.

Um zu klären, ob bei einer Tritium-Übertragung

Anteil des Östradiol-Wasserstoffs an der Keto-Reduktion

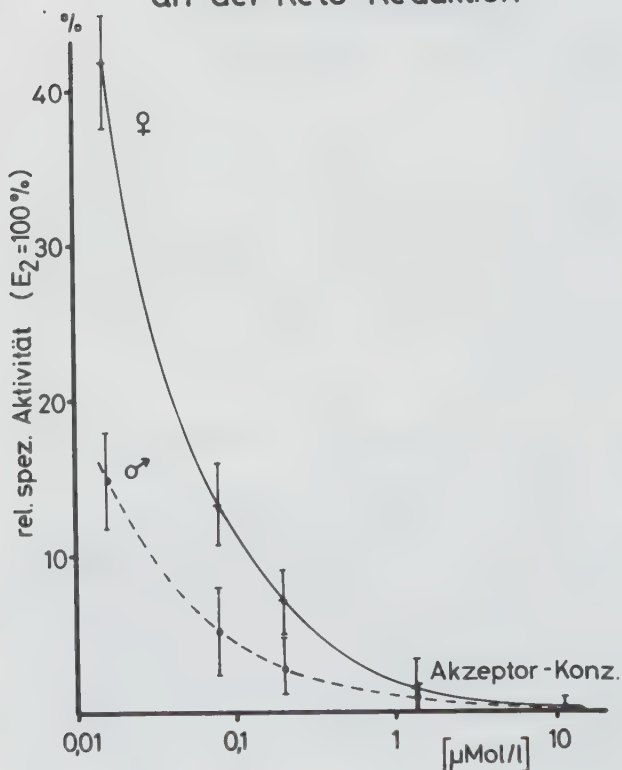


Abb.12 : Relative spezifische Aktivität des mit Tritium markierten 4-¹⁴C-20α-Hydroxycortison nach der Inkubation mit Östradiol-17α-T in Leberschnitten weiblicher und männlicher Ratten in Abhängigkeit von der Cortisonkonzentration

Ansätze: 100 mg Leber wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

Östradiol-17α-T: 0,5 μMol/l

n = 2.

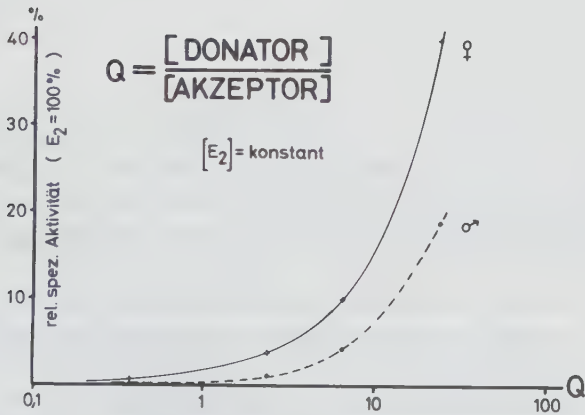
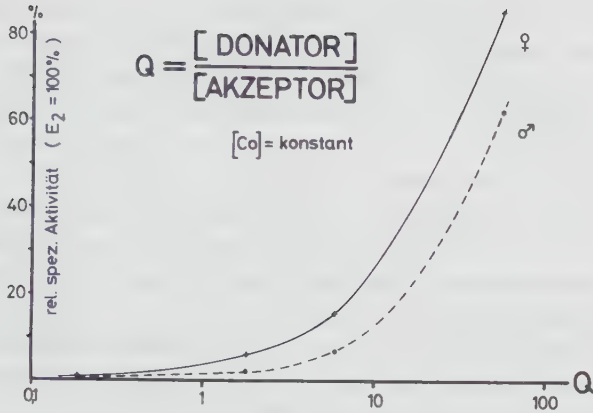


Abb.13a : Relative spezifische Aktivität des mit Tritium markierten 4- ^{14}C -20 α -Hydroxycortison in Abhängigkeit von Q . Cortison-Konzentration = konstant

Abb.13b : Relative spezifische Aktivität des mit Tritium markierten 4- ^{14}C -20 α -Hydroxycortison in Abhängigkeit von Q . Östradiol-Konzentration = konstant

nur das Konzentrationsverhältnis Donator : Akzeptor, also Q, oder auch andere Faktoren eine Rolle spielen, wurden die Ergebnisse der Seite 30 und 32 in ein neues Koordinatensystem transformiert. Auf der Abszisse wurden die Quotienten Q aufgetragen. Die Ordinate gibt weiterhin die relative spezifische Aktivität an. Die Ergebnisse der Abbildung 11 sind in der Abbildung 13a, die der Abbildung 12 in 13b wiedergegeben.

Der Vergleich der korrespondierenden Kurvenpaare zeigt, daß das Verhältnis der Donatorkonzentration zur Akzeptorkonzentration der bestimmende Faktor für eine Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison ist. Der geringe Unterschied zwischen Weibchen und Männchen wird wahrscheinlich durch die verschiedene Enzymausstattung der Geschlechter verursacht.

C. 2. Organspezifität

Zu dieser Untersuchung wurden die Sexualorgane männlicher und weiblicher Ratten, sowie Niere und Nebenniere herangezogen; das Diaphragma, das nur geringe Enzymaktivitäten aufweist, diente zur Kontrolle und zum Vergleich.

Die Konzentration des ^{14}C -markierten Akzeptors betrug 0,175 $\mu\text{Mol/l}$, die Donatorkonzentration 0,5 $\mu\text{Mol/l}$.

Sowohl in männlichen, als auch in weiblichen Sexualorganen der Ratte reduziert der Östradiol-Wasserstoff Cortison (Abb. 14). Das Ausmaß der Tritium-Übertragung ist im Vergleich zur Leber, bis auf das Ergebnis in den Nieren, jedoch sehr gering. Nur 1-2% der Gesamtreduktion wird durch Östradiol-Wasserstoff bewirkt.

Zur Identifizierung der aus Östradiol-17 α -T und Cortison neu gebildeten, radioaktiven Verbindung nach Inkubation mit Uterusschnitten wurde das entsprechende Maximum- analog den Angaben der Tabelle 1- untersucht:

Maßnahme zur Identifizierung	Ergebnisse	
	inaktiv Referenzsubst.	radioaktiv
1. Dünnschichtchromatographie in Laufmittel 1	<u>Rf-Wert</u> 0,27	0,27
2. Rechromatographie des peaks von 1 in System 3	0,49	0,49
3. Elution der radioaktiven Maxima mit Aceton, Mikro- acetylierung, dann DC der Acetate in System 2	0,64	0,65
4. Oxydation mit $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, abgetrennte, organische Phase auf eine DC-Platte aufgetragen (Laufmittel- system 3)	* 92% der Tritium-Aktivität in der wäßrigen Phase wiedergefunden. Rf-Wert der oxydierten Substanz gleich der Referenzsub- stanz (s. Tabelle 1)	
Die Ergebnisse lieferten den Beweis, daß die Substanz mit 20 α -Hydroxycortison identisch ist.		
Hinweis: Wegen der geringen Metabolitenbildung einer Inku- bation mit Uterusschnitten wurden acht DC-Aufar- beitungen gesammelt, vereinigt und geprüft.		

Bemerkenswert war die geringe Ausbeute in der Nebenniere. Im Einklang hiermit stehen die Beobachtungen, daß die Inaktivierung des Cortisons hauptsächlich in der Leber und nur im geringen Maße noch in der Niere (Lit. 19, 20) und Muskel (Lit. 21) stattfindet.

Entgegen der Ansicht von Jensen, nach der im Uterus keine enzymatische Umwandlung von Östradiol zu Östron erfolgen soll, konnte nicht nur ein meßbarer Tritium-Transfer auf Cortison, sondern auch eine geringe Oxydation des Östradiols festgestellt werden.

Neben Östradiol-17 α -T und Cortison wurden auch folgende Redoxpaare zur Untersuchung der Organspezifität

Organspezifität der Cortison- Reduktion durch $E_2-17\alpha-T$

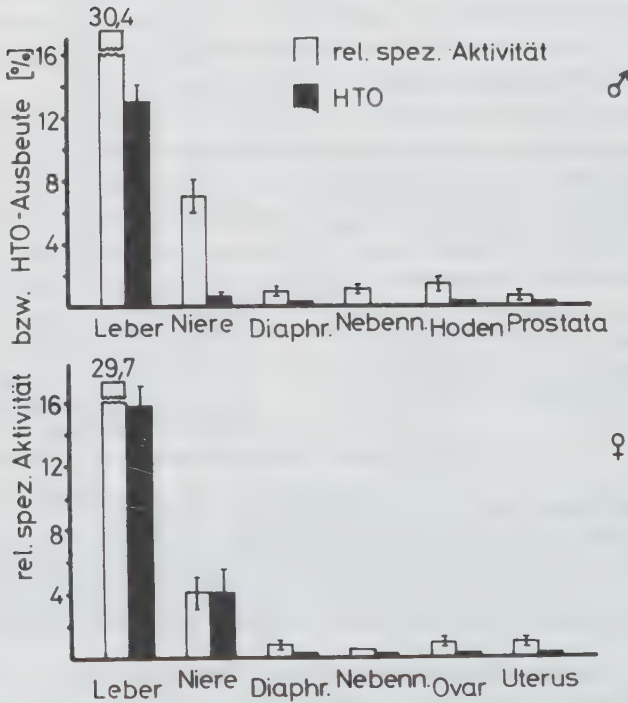


Abb.14 : Organspezifität der Reduktion von $4-^{14}C$ -Cortison durch Östradiol- $17\alpha-T$

Ansätze: Je 100 mg Gewebe wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, bei $37^{\circ}C$ 30 Minuten inkubiert.

Östradiol- $17\alpha-T$: 0,5 $\mu\text{Mol/l}$

Cortison- $4-^{14}C$: 0,175 $\mu\text{Mol/l}$

Ordinate: spezifische Aktivität des $4-^{14}C$ - 20α -Hydroxycortison- $20\beta-T$ bezogen auf die spez. Aktivität des Östradiols (= 100%).

n = 2.

herangezogen:

Östradiol-17 α -T + Progesteron

Metenolon-17 α -T + Progesteron

Metenolon-17 α -T + Cortison.

In der Tabelle 3 sind die HTO-Ausbeuten dieser Reaktionen zusammengestellt. In der 5. Spalte stehen die von Wenzel und Mützel (Lit. 4) gefundenen Werte aus dem Redoxpaar

Östradiol-17 α -T + 5 α -Androsten(3)-on(17).

Durch Zugabe eines 17-Ketosteroids wird die Oxydation des Östradiols mehr beschleunigt als beim Zusatz eines 20-Ketosteroids.

Ein Vertauschen der 20-Keto-Verbindungen als Akzeptoren liefert nur geringe Unterschiede.

Wird jedoch der Donator Östradiol-17 α -T durch Metenolon-17 α -T ersetzt, tritt eine verstärkte Oxydation des Donators bei Inkubation mit Progesteron im Vergleich zu Cortison ein.

Die sexualspezifischen Unterschiede sind in der Leber weniger ausgeprägt als in der Niere. Bei den 21-C-Steroiden beträgt die Tritium-Übertragung der Männchen etwa 1/10 der der Weibchen und bei 17-C-Steroiden nur die Hälfte.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe beweisen, daß nur in solchen Organen der Tritium-Transfer auftritt, in denen die Aktivität der entsprechenden Dehydrogenasen für Östradiol, Cortison und Progesteron besonders groß ist. Die Leber, das Organ mit der höchsten Enzymaktivität, ist somit auch der Ort des maximalen Tritium-Transfers von Östradiol-17 α -T auf Cortison, Progesteron und 5 α -Androsten(3)-on(17).

ORGANSPEZIFITÄT

der HTO-Bildung bei der Reduktion von Cortison, Progesteron und 5 α -Androsten(3)-on(17) durch Östradiol-17 α -T und Metenolon-17 α -T

	% der eingesetzten Radioaktivität in HTO					
	Östradiol-17 α -T		Metenolon-17 α -T		Östradiol-17 α -T	
	+Cort.	+ Prog.	+Cort.	+ Prog.	+5 α -And.	Kontroll- le
Uterus	0,09	0,12	0,23	0,10	0,68	0,08
Ovar	0,11	0,42	0,44	0,16	2,33	0,09
Leber	14,0	15,5	29,4	44,3	61,5	0,48
Niere	4,1	6,7	4,6	7,8	19,9	0,27
Nebenniere	0,11	0,12	0,14	0,11	---	---
Diaphragma	0,06	0,20	0,07	0,07	0,56	0,04
Hoden	0,27	0,30	1,31	1,55	1,08	0,08
Prostata	0,23	0,12	0,12	0,12	1,54	0,06
Leber	12,9	13,9	27,9	45,2	71,2	0,52
Niere	0,32	0,29	0,23	1,07	8,52	0,18
Nebenniere	0,10	0,08	0,08	0,12	---	---
Diaphragma	0,04	0,06	0,04	0,06	0,31	0,04

Tabelle 3: 100 mg Gewebe wurden in 4 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Gewebeteile wurden abzentrifugiert und 0,5 ml der wässrigen Lösung zur Gefrierdestillation verwendet. Die ermittelten HTO-Ausbeuten sind in % der eingesetzten Aktivität angegeben.
n = 2.

C. 3. Beeinflussung der Östradioloxydation
in vivo und in vitro durch Cortison

Alle bisherigen Experimente zur Tritium-Übertragung bezogen sich immer nur auf die Reduktion des eingesetzten Cortisons und auf die Bestimmung von 20 α -Hydroxycortison. Hier soll nun versucht werden, den Östradiol-Stoffwechsel durch Gaben von Cortison sowohl in vivo als auch in vitro zu beeinflussen.

a) in vitro

Wird Östradiol-4-¹⁴C mit 100 mg Leberschnitten weiblicher Ratten inkubiert, so beträgt die Östradiol-Konzentration nach 10 Minuten 45% und nach 30 Minuten nur noch 30% der eingesetzten Aktivität (Abb. 15). Wird den Ansätzen ein 200facher Überschuß an Cortison zugegeben, dann erfolgt eine beschleunigte Oxydation des Östradiols in den ersten 30 Minuten. Nach 45 Minuten werden unabhängig von der zugegebenen Cortisonmenge gleichviel Östradiol zu Östron oxydiert.

b) in vivo

Mit Hilfe einer früher beschriebenen Methode gelang es, die in vivo Oxydation von Steroiden im Gesamttier durch Injektion von solchen Steroiden zu verfolgen, die in bestimmter Position mit Tritium "stoffwechsel-labil" markiert sind (Lit. 22, 23). Mit Hilfe von Östradiol-17 α -T wurde die Mindestoxydation von Östradiol in weiblichen Ratten ermittelt, und zwar durch Messung der spezifischen Tritium-Aktivität in einer ausgeschiedenen, destillierten Körperwasserprobe (s. Methodik).

Die ermittelte Zeitabhängigkeit der Oxydation von Östradiol-17 α -T zeigt Abbildung 16. Der rasche Abbau des Östrogens -bereits nach 6 Stunden sind 50% der injizierten Dosis verstoffwechselt- stimmt mit dem von Wenzel et al. (Lit. 4) gefundenen Ergebnis gut überein. Bei gleichzeitiger subcutaner Injektion von 30 mg Cortison/kg Körpergewicht wurde pro Zeiteinheit etwa 10% mehr HTO ausgeschieden als bei reiner Östradioloxydation. Entspre-

Einfluß von Cortison auf die Östradiol-Oxydation (in vitro)

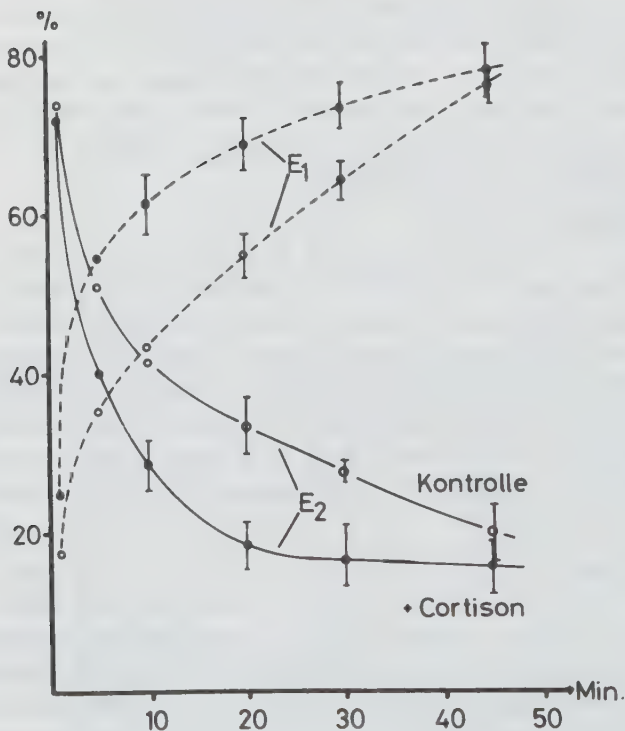


Abb.15 : Oxydation von $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Östradiol zu $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Östron bei An- und Abwesenheit von Cortison

Ansätze: 100 mg Leberschnitte von Rattenweibchen wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, bei 37°C inkubiert.

$4\text{-}^{14}\text{C}$ -Östradiol: $0,5\text{ }\mu\text{Mol/l}$

Cortison: $100\text{ }\mu\text{Mol/l}$

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität in Östron oder Östradiol

$n = 2$.

$p = 0,001$ $t = 20\text{ Min.}$

Einfluß von Cortison auf die Östradiol-Oxydation (in vivo)

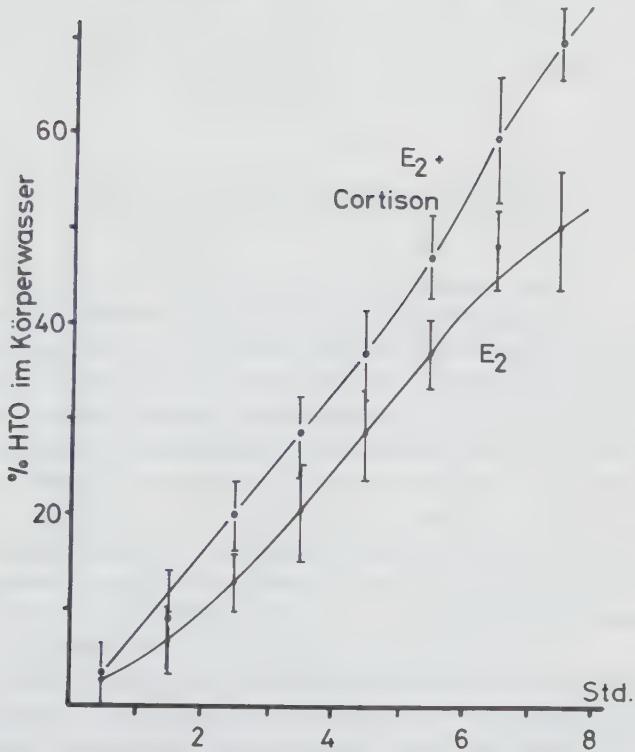


Abb.16 : Oxydation von Östradiol-17 α -T in weiblichen Ratten gemessen durch Radiospirometrie

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der Oxydation am C-17-Atom.
Injektion der in Äthanol gelösten Steroide:

Östradiol-17 α -T: 11,5 μ Ci = 4 γ /kg Ratte

Cortison: 30 mg/kg Ratte

n = 2.

p = 0,001 t = 8 Std.

chende Experimente mit Rattenmännchen unter gleichen Versuchsbedingungen ergaben den gleichen Effekt.

Die Signifikanz des Unterschieds zwischen den Kontrollwerten und den Werten, die mit Cortisongaben gewonnen wurden, festigt die Annahme, daß die Spezifität der Tritium-Übertragung auf Cortison in vitro und in vivo nur gering ist, und daß die Oxydation des Östradiols durch das Nebennierenrindenhormon wenig beeinflußt wird.

C. 4. Östradioloxydation im Rattenuterus

Die Ergebnisse der Abbildung 14 zeigen, daß im Uterus eine geringe, aber meßbare Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison stattfindet. Eine Inaktivierung des Östradiols zu Östron muß also in diesem Organ erfolgt sein. Es sollte nun versucht werden, die Oxydation des Östradiols im Rattenuterus zu bestätigen und die Eigenschaften der uterinen Oxydoreduktase näher kennen zu lernen.

Wie auch in den vorherigen Versuchen wurden für das Studium die in vitro Technik der Gewebeschnitte und -homogenate gewählt.

Die Aktivität der enzymatischen Reaktionen in vivo hängt vom Funktionszustand des Organs ab. Deshalb wurden die Versuche in allen Cyclusphasen durchgeführt (Lit. 52). Nachdem bei geschlechtsreifen Weibchen der Cyclus über etwa zwei Wochen durch Vaginaabstriche verfolgt worden war, wurden die Uteri der Tiere aus den verschiedenen Cyclusstadien in vitro mit Östradiol-2,4,6,7-T inkubiert (s. Methodik). Durch Dünnschichtchromatographie des lipophilen Extraktes des Inkubationsansatzes wurde anschließend die Menge der Östronbildung bestimmt.

Aus Abbildung 17 läßt sich bei einer Östradiol-Konzentration von 10^{-10} Mol/l eine Cyclusabhängigkeit der Östradioloxydation feststellen. Das Maximum der Östronbildung zeigt sich am 1. Östrus-Tag, das Minimum im Pro-

Östrus, ein Beweis dafür, daß die Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vom physiologischen Zustand des Zielorgans abhängt.

Wenzel und Mitarbeiter (Lit. 4) haben bereits früher erkannt, daß im Rattenuterus die Östronbildung bei Anwesenheit von $100 \mu\text{Mol/l}$ 5α -Androsten(3)-on(17) signifikant vermehrt wird.

Ob auch durch Zugabe von Cortison die Östradioloxydation beeinflußt werden kann, zeigt der folgende Versuch. $100 \mu\text{Mol/l}$ Cortison hemmte in allen untersuchten Cyclusstadien die Östradioloxydation (Abb. 17). Da diese Tatsache mit den Befunden von Wenzel, der durch 5α -Androsten(3)-on(17)-Zugabe eine vermehrte Östronbildung beobachtete, nicht übereinstimmt, wurde vermutet, daß jene verstärkte Oxydation sich nur bei der hohen Östradiol-Konzentration von 10^{-7} Mol/l nachweisen läßt. Kontrollversuche, bei denen der Einfluß von 5α -Androsten(3)-on(17) mit geringerer Östradiol-Konzentration (10^{-10} Mol/l) untersucht wurde, bestätigten diese Annahme, wie auch die Abbildung 17 zeigt.

Einen weiteren Beweis für die Oxydation des Östradiols im Uterus zeigt die Abbildung 18. Wird dem Uterushomogenat (Testanordnung 2) Östradiol-4- ^{14}C in steigender Konzentration zugesetzt, so entsteht bis zur Sättigung Östron.

Die Beziehung zwischen der Substratkonzentration und den Ausbeuten an Östron wurde nach Lineweaver-Burk wiedergegeben. Danach ergibt sich für das Enzym im Uterushomogenat ein K_m -Wert für Östradiol $4 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$ ($\text{pH} = 7,4$). Die berechnete Konstante unterscheidet sich nicht wesentlich von den bisher bekannt gewordenen Michaelis-Menten-Konstanten für Östradiol anderer Organe (Lit. 53-55).

E₂-Oxydation in Rattenuteri in versch. Cyclus-Phasen

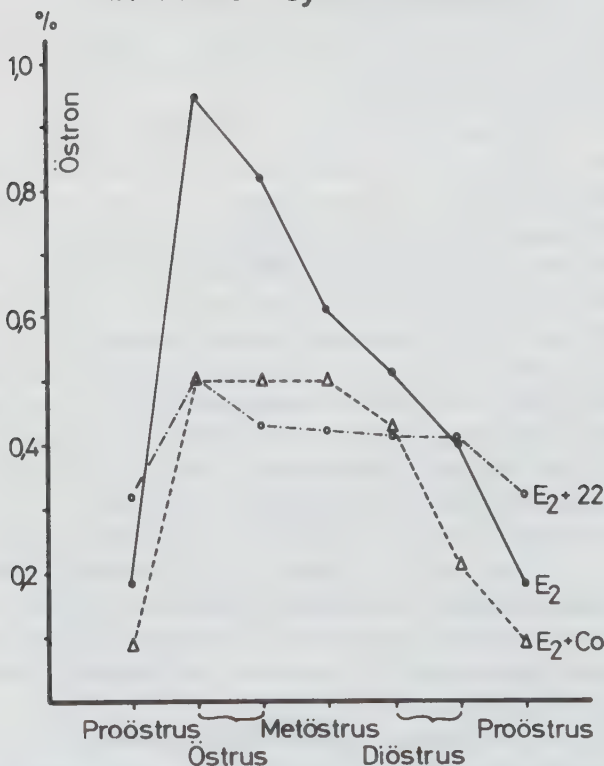


Abb.17 : Östradiol-2,4,6,7-T-Oxydation in Abhängigkeit der Cyclus-Phasen im Uterus von Ratten bei An- und Abwesenheit von Cortison und 5 α -Androsten(3)-on(17)

Ansätze: Je 100 mg Uterus-Gewebe wurden zusammen mit den Steroiden in 4,0 ml Ringier-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 15 Minuten bei 37° C inkubiert.

Östradiol-2,4,6,7-T: $2,5 \cdot 10^{-10}$ Mol/l

inaktive Steroide: je 100 μ Mol/l

Ordinate: aus 2,4,6,7-T-Östradiol gebildetes 2,4,6,7-T-Östron in % der eingesetzten Aktivität

n = 2.

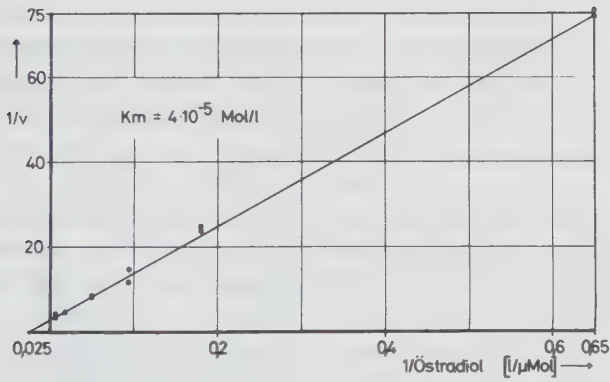


Abb.18 : Bestimmung des K_m -Wertes nach Lineweaver-Burk für Östradiol

Ansätze: Je ein halber Uterus wurde in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 30 Minuten inkubiert.

Es wurde die Oxydation von Östradiol-4- ^{14}C in Abhängigkeit der Östradiolkonzentration verfolgt und das gebildete Östron gemessen.

C. 5. Induktion der Oxydoreduktase im Uterus
nach hormonaler Vorbehandlung

Mit dem Nachweis, daß Östradiol im Rattenuterus zu Östron oxydiert wird, stellt sich die Frage, ob im Erfolgsorgan des Östrogens durch eine Vorbehandlung mit inaktivem Östradiol die enzymatische Inaktivierung zu Östron verstärkt wird. Versuche von Jütting (Lit. 56) bei Kaninchen zeigten, daß durch Östradiolgabe im Uterus die Aktivität einer 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase erhöht werden kann. Diese uterine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ist zum ersten Mal 1967 aus dem Myometrium trächtiger Tiere angereichert und auch teilweise charakterisiert worden (Lit. 57).

Hier soll nun versucht werden, die Aktivität dieses Enzyms in Rattenuteri nach Hormongabe zu erhöhen, die optimalen Bedingungen für die Östradioloxydation aufzuzeigen und den Einfluß verschiedener Steroide auf die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität anzugeben.

Für die Aktivitätsbestimmung des Enzyms im Rattenuterus wird mit Hilfe von ^{14}C -markiertem Östradiol die Oxydationsrate an 4- ^{14}C -Östron bestimmt.

Die spezifische Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wird durch die gebildete Menge nMol Östron pro 60 Minuten und pro 100 mg Feuchtgewicht dargestellt.

Die Substanzen wurden in Äthanol gelöst, und jeweils 0,1 ml der Lösung mit 5 mg Steroid/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 16 Stunden wurden die Tiere getötet und die Uteri entnommen (weitere Aufarbeitung s. Methodik).

Zuerst wurde die Wirkung verschiedener Steroide auf die Enzyminduktion geprüft.

Tabelle 4 gibt die enzymatische Aktivität der Uteri in Bezug auf die Östradioloxydation nach Induktion durch verschiedene Steroide an. In der letzten Spalte

Vorbehandelt mit	n	$\frac{\text{nMol Östron}}{60 \text{ Min} \cdot 100\text{mg}}$	Relation zur Kontrolle
<u>Erwachsene Ratten</u>			
Unvorbehandelt	14	$2,04 \pm 1,7 \cdot 10^{-2}$	1,0
Östradiol	6	$17,7 \pm 5,4 \cdot 10^{-2}$	8,7
Diäthylstilböstrol	4	$57,2 \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$	27,9
5 α -Androsten(3)-on(17)	4	$10,2 \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$	5,0
5 α -Androsten(3)-ol(17)	2	$2,93 \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$	1,5
Cortison	2	5,21	2,7
Progesteron	2	3,12	1,6
Testosteron	2	2,53	1,3
Δ^4 -Androsten-3-on	2	3,44	1,8
Δ^4 -Androsten-3,17-dion	2	3,68	1,9
Östron	2	3,87	2,0
Metenolon	2	2,76	1,4

<u>Infantile Ratten</u>			
Unvorbehandelt	4	$47,2 \pm 6,1 \cdot 10^{-2}$	1,0
Östradiol	4	$54,8 \pm 2,2 \cdot 10^{-2}$	1,2
Diäthylstilböstrol	4	$143,0 \pm 1,6 \cdot 10^{-2}$	3,0
5 α -Androsten(3)-on(17)	4	$76,5 \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$	1,6

Tabelle 4 :Einfluß der Steroidvorbehandlung auf die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität im Rattenuterus

Die Substanzen wurden in Äthanol gelöst und jeweils 0,1 ml der Lösung mit 5 mg/kg i.p. injiziert. Nach 16 Stunden wurden die Tiere getötet, die Uteri entnommen und die Aktivität der Dehydrogenase mit 4- ^{14}C -Östradiol als Substrat nach der oben angegebenen Vorschrift bestimmt.
Östradiol-4- ^{14}C : 0,5 $\mu\text{Mol/l}$

sind die Relationen zur Kontrolle bei unvorbehandelten Ratten angegeben. Man stellt fest, daß die Vorbehandlung mit Östradiol und Diäthylstilböstrol eine auf das 10- bis 20fache gesteigerte Oxydation von Östradiol zu Östron bewirkt. Überraschenderweise wurde die Dehydrogenase auch durch 5α -Androsten(3)-on(17) induziert. Alle anderen Steroide beeinflussen die Enzymaktivität nicht, auch nicht das chemisch nahe verwandte 5α -Androsten(3)-ol(17).

Nach Applikation von Östradiol, Stilböstrol und 5α -Androsten(3)-on(17) steigt die Aktivität im Uterus infantiler Ratten nur gering an. Auffällig ist der große Unterschied der Dehydrogenase-Aktivität pro Gewichtseinheit zwischen erwachsenen und infantilen Ratten. Es ist jedoch zu beachten, daß die Werte für einen infantilen Rattenuterus mit ca. 20 mg Feuchtgewicht bestimmt und auf 100 mg umgerechnet worden sind.

Der Östrogenbedingte Anstieg der Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in infantilen Rattenuteri kann trotz 6-tägiger Gabe von je 1 mg Progesteron/kg Körpergewicht und am 6. Tag von 1 mg Östradiol/kg KG nicht induziert werden.

Für die weiteren Versuche wurde die optimale Inkubationszeit ermittelt. Die Proportionalität zwischen Ausbeute an Östron und Inkubationszeit ist bis 30 Minuten gegeben (Abb. 19).

Abbildung 20 gibt die Induktion der Oxydoreduktase im Rattenuterus in Abhängigkeit von der applizierten Dosis sowohl für Östradiol, als auch für 5α -Androsten(3)-on(17) wieder.

Die niedrigste Dosis von Östradiol, die injiziert werden mußte, um nach 16 Stunden die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase des Uterus zu induzieren, betrug 10 γ /kg KG. Entgegen den Beobachtungen von Jütting rief die physiologische Dosis von 1 γ /kg KG keine Enzyminduktion hervor, jedoch bezog Jütting die Aktivität des Enzyms auf das Proteingewicht des Kaninchenmyometriums, und nicht wie hier auf das Feuchtgewicht des Uterus (Lit. 60).

16 Stunden nach Applikation von 1000 γ /kg KG steigt die Enzymkonzentration auf das 10fache an.

ZEITABHÄNGIGKEIT DER ÖSTRADIOL - OXYDATION

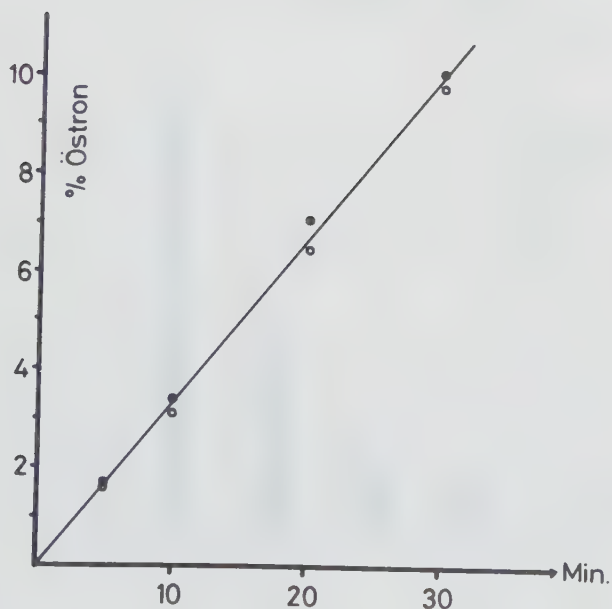


Abb.19 : Östradiol-Oxydation im Rattenuterus in
Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Ansätze: 200 mg Uterusschnitte wurden
in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH
7,4, bei 37° C inkubiert.

Östradiol-4-¹⁴C: 0,5 µMol/l

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität
n = 2.

Induktion der 17 β -OH-Steroid-DH

(Dosisabhängigkeit)

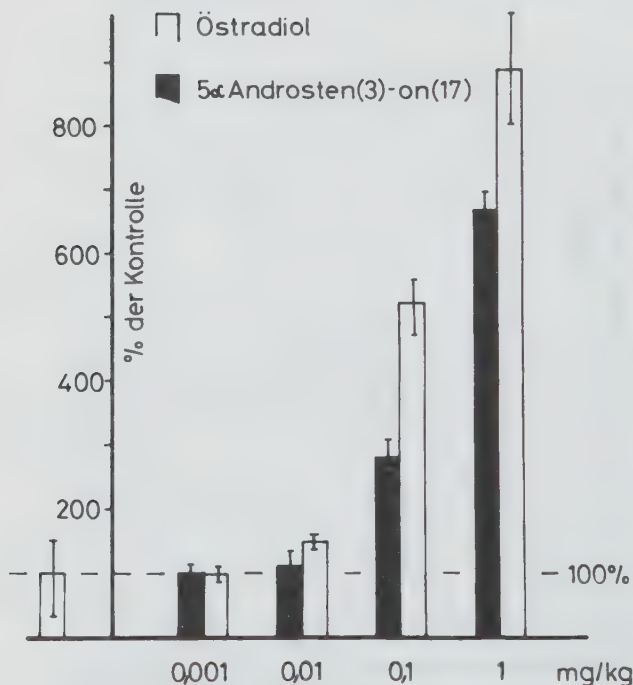


Abb.20 : Oxydation von Östradiol-4-¹⁴C zu Östron in Uteri in Abhängigkeit einer mit verschiedenen Dosen Östradiol bzw. 5 α -Androsten(3)-on(17) vorbehandelten Ratte.

Ansätze: 16 Stunden nach i.p. Applikation der Steroide wurden 200 mg Uterus-Gewebe in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Östradiol-4-¹⁴C: 0,5 μ Mol/l

Ordinate: Änderung der Enzymaktivität in % des Wertes vor Hormongabe

n = 2.

Die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ist auch durch verschiedene Gaben von 5 α -Androsten(3)-on(17) zu beeinflussen, wie aus der Abbildung ebenfalls zu ersehen ist. Nach 16 Stunden einer Gabe von 1000 γ /kg KG steigt die Enzyminduktion auf das 6,5fache an. Es soll später versucht werden, das ähnliche Verhalten dieser Substanz in Abhängigkeit von der applizierten Dosis näher zu charakterisieren.

Die Aktivität des Enzyms wurde außer im Uterus auch in den Stoffwechselorganen Leber und Niere bestimmt. In beiden Organen war sie von vornherein um ein Vielfaches höher, aber nach Gaben von Östradiol änderte sie sich nicht.

Die Induktion des Enzyms im Uterus ist außer von der Hormonmenge auch von der Dauer der Hormoneinwirkung abhängig. Nach einer einmaligen Injektion von 1 mg Östradiol/kg KG war die Aktivität nach verschiedenen Zeiten gemessen worden. 5 Stunden nach der Gabe wurde ein Anstieg auf etwa das 4fache des Kontrollwertes vor Hormongabe, nach 20 Stunden etwa das 9fache gefunden (Abb. 21). 90 Stunden nach der Injektion war die Änderung gegenüber dem Kontrollwert nur gering. 5 α -Androsten(3)-on(17) zeigte wieder ein ähnliches Verhalten wie Östradiol. Nach 20 Stunden war das Maximum des Aktivitätsanstiegs erreicht (7fach), bei längerer Einwirkung des Steroids nahm die Enzymaktivität analog dem des Östrogens wieder stetig ab.

Eine Potenzierung der Enzyminduktion wurde durch tägliche Applikation von 1 mg Östradiol/kg KG erreicht. Am 4. Tag nach Beginn der täglichen Injektionen ist 30fach mehr Östradiol oxydiert worden, weitere Gaben von Östradiol verminderten die Enzyminduktion nur geringfügig (Abb. 22).

Überlegungen, ob die Enzyminduktion des Östradiols im Uterus von einer DNS-Neusynthese abhängig ist, konnten mit Hilfe von Actinomycin D geprüft werden (Lit. 61, 63). Das Antibiotikum blockiert die Weitergabe der in der DNS gespeicherten genetischen Information durch Hemmung der RNS-Polymerasen (Lit. 64), so daß die DNS- und damit auch eine Proteinneusynthese durch Östradiol am

Induktion der 17 β -OH-Steroid-DH

(1mg Steroid / kg KG)

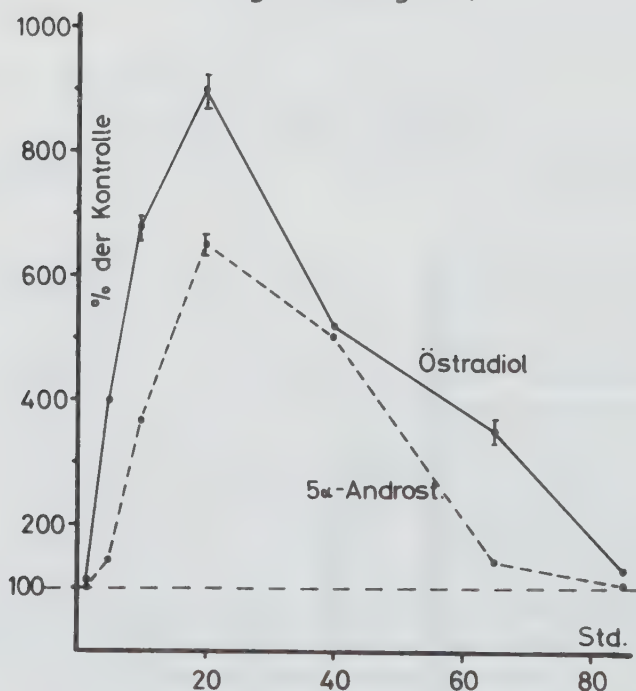


Abb.21 : Enzyminduktion der uterinen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase einer einmaligen Injektion von 1 mg/kg Ratte Östradiol bzw. 5 α -Androsten(3)-on(17)

Ansätze: 200 mg Uterusschnitte wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 30 Minuten bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert.

Östradiol-4- 14 C: 0,5 μ Mol/l

Ordinate: Änderung der Östronmenge in % des Wertes einer nicht vorbehandelten Ratte (= 100%).

n = 2.

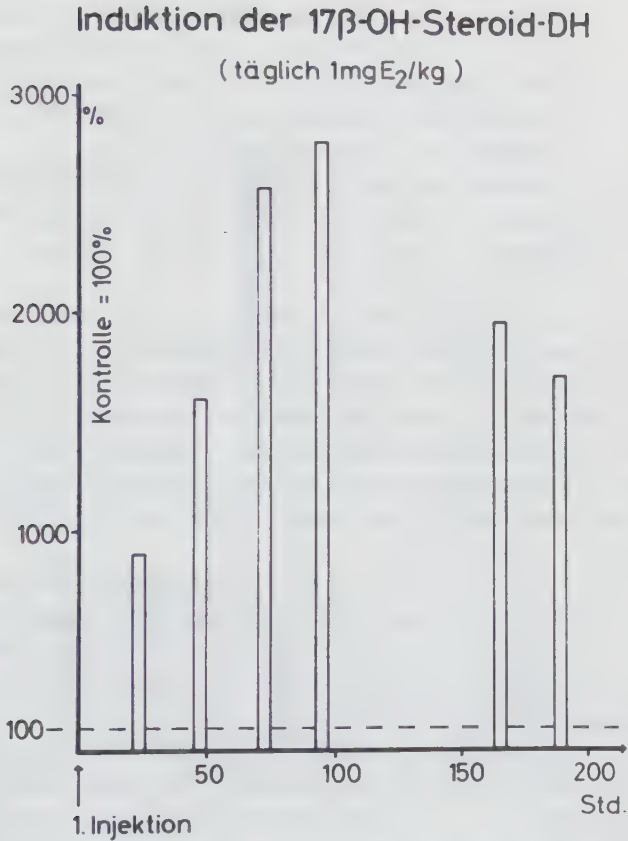


Abb.22 : Enzyminduktion der uterinen 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nach täglichen Injektionen von je 1 mg Östradiol/kg Ratte.

Ansätze: 200 mg Uterusschnitte wurden in $4,0\text{ ml}$ Ringer-Phosphat-Puffer, $\text{pH } 7,4$, 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Östradiol- $4\text{-}^{14}\text{C}$: $0,5\text{ }\mu\text{Mol/l}$

Ordinate: Änderung der Östronmenge in % des Wertes einer nicht vorbehandelten Ratte (= 100%)

$n = 2$.

Wirkungsort gehemmt werden kann.

Wegen der großen Toxizität der Substanz wurde die Gesamtmenge von 600 γ /kg KG in 4 Einzeldosen aufgeteilt. 30 Minuten vor der Injektion von 1 mg Östradiol/kg KG wurde die erste Gabe appliziert, die weiteren 3 Dosen wurden in Abständen von 1 Stunde gespritzt.

Der Aktivitätsanstieg der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch Östradiol oder 5 α -Androsten(3)-on(17) wurde durch gleichzeitige Gabe von Actinomycin D gehemmt (Abb. 23).

Die Primärreaktion des Östradiols im Uterus soll nach Jensen (Lit. 10, 46, 47) die Bindung des Hormons an einen spezifischen Rezeptor im Uterus sein. Die Hormonwirkung unterbleibt, wenn Östradiol im Erfolgsorgan nicht gebunden wird. Für den Beweis dieser Hypothese wurden unter anderem die Ergebnisse mit dem Antiöstrogen Upjohn 11-100 herangezogen, weil diese Substanz die Östradiol-Bindung blockiert (Lit. 65, 66).

Die Untersuchungen mit der Substanz zeigten, daß die Enzyminduktion durch Östradiol und Diäthylstilböstrol in Anwesenheit von Upjohn 11-100 blockiert wird, während das Antiöstrogen die Wirkung von 5 α -Androsten(3)-on(17) nicht beeinflußt (Abb. 23).

Ist die Enzyminduktion der Östrogene durch 5 α -Androsten(3)-on(17) beeinflusbar? Bei gleichzeitiger Applikation von je 1 mg Östradiol und 5 α -Androsten(3)-on(17)/kg KG war die Enzymleistung beider Steroide kleiner als die Einzelwirkung von Östradiol. Eine erwartete Potenzierung trat nicht auf. Der Effekt war mit Diäthylstilböstrol noch deutlicher ausgeprägt, da die Oxydation von Östradiol zu Östron um die Hälfte vermindert wurde.

Bei zusätzlicher Gabe von Upjohn 11-100 wurde jedoch die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nicht so stark gehemmt, wie die östrogenen Steroide durch das Antiöstrogen allein blockiert wurden. Die spezifische Enzymaktivität des 5 α -Androsten(3)-on(17) bleibt in jedem Falle erhalten (Abb. 24).

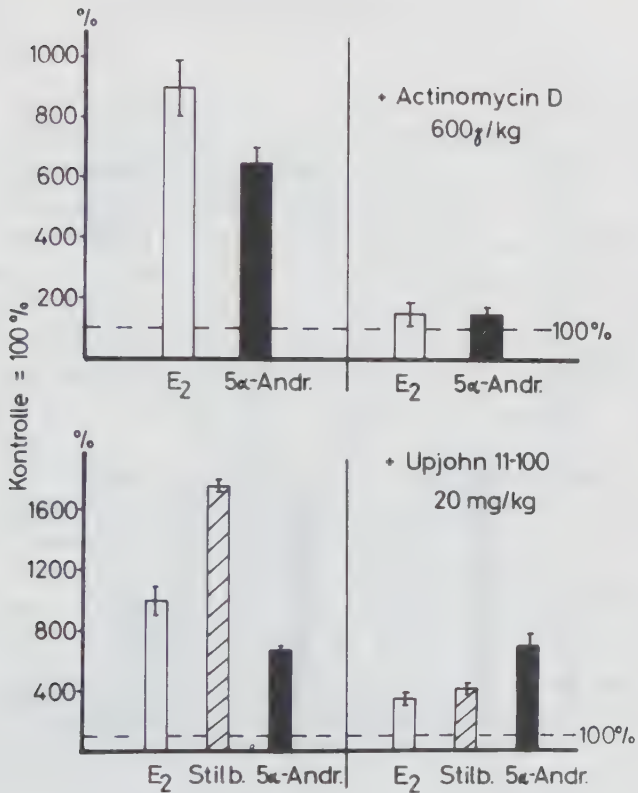


Abb.23 oben: Aktivitätsänderung der uterinen 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase nach Applikation von Östradiol bzw. 5α-Androsten(3)-on(17) (je 1 mg/kg KG) mit Actinomycin D
Ansätze: 16 Stunden nach i.p. Applikation der Substanzen wurden die Tiere getötet und die Uteri entnommen. Anschließend wird die Enzymaktivität bestimmt.
Östradiol-4-¹⁴C: 0,5 μMol/l
Ordinate: Enzymaktivität bezogen auf Werte der nicht vorbehandelten Kontrolltiere (= 100%).
n = 4.

unten: Aktivitätsänderung der uterinen 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase nach Applikation von Östradiol, 5α-Androsten(3)-on(17) und Stilb-östrol mit Upjohn 11-100
Ansätze: wie oben beschrieben.
n = 2.

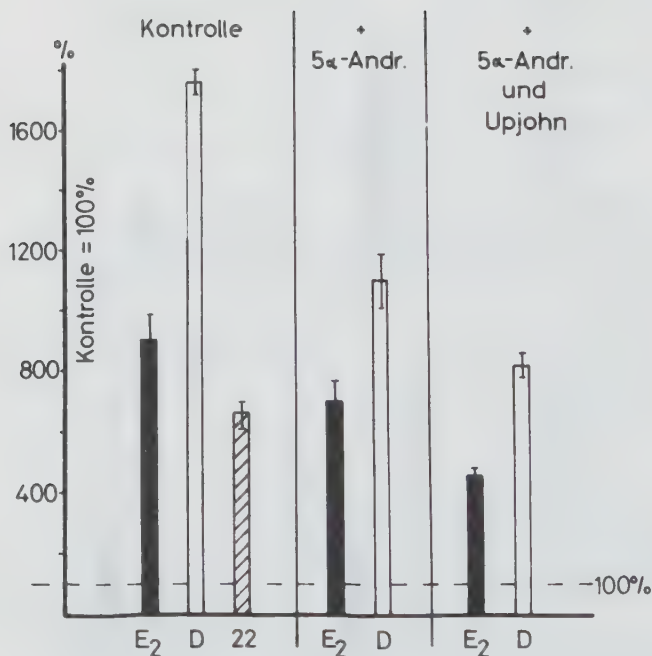


Abb.24 : Aktivitätsänderung der uterinen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nach Applikation von Östradiol und Diäthylstilböstrol mit 5 α -Androsten(3)-on(17) (22) (1 mg/kg KG) und Upjohn 11-100 (20 mg/kg KG)

Ansätze: 16 Stunden nach i.p. Applikation der Substanzen wurden die Tiere getötet und die Uteri entnommen; anschließend die Enzymaktivität bestimmt.

Östradiol-4-¹⁴C: 0,5 μ Mol/l

Ordinate: Enzymaktivität bezogen auf Werte der nicht vorbehandelten Kontrolltiere (= 100%).

n = 4.

C. 6. Charakterisierung der 17 β -Hydroxy-
steroid-Dehydrogenase

Die Inaktivierung von Östradiol im Uterus wird nach den angeführten Ergebnissen durch ein Enzym katalysiert, das Oxydoreduktionen am C-17-Atom vermittelt. Diese 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wurde nicht nur im Cytoplasma und in Mikrosomen der menschlichen Placenta, sondern auch in der Leber und anderen Organen nachgewiesen (Lit. 67, 69-71). Die NAD- und NADP-abhängigen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen der Leber besitzen keine große Substratspezifität. Neben Östradiol wird auch Testosteron oxydiert (Lit. 68, 72). Die katalysierten Reaktionen sind reversibel.

Sind diese biochemischen Eigenschaften der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in der Leber vergleichbar mit denen im Rattenuterus?

Zur Messung der Oxydation von 17 β -Hydroxysteroiden wurden die folgenden ¹⁴C-markierten Steroide Östradiol, Testosteron, Metenolon und 5 α -Androsten(3)-ol(17) eingesetzt. Die Oxydation durch das Uterusgewebe wurde gemessen einmal ohne Vorbehandlung der Tiere, zum anderen Mal 16 Stunden nach einer Injektion von 1 mg Östradiol/kg KG.

Nach Applikation des Östradiols stieg die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus an. Das Ausmaß der Oxydation von Östradiol und Testosteron erreichte das 10fache des Kontrollwertes vor Hormongabe. Die Oxydation von Metenolon war dagegen geringer, 5 α -Androsten(3)-ol(17) wurde nicht vermehrt oxydiert (Abb. 25).

Die Reduktionen am C-17-Atom wurden von 4-¹⁴C-Östron, 4-¹⁴C-Androstendion und 4-¹⁴C-5 α -Androsten(3)-on(17) verfolgt. Die durch Östradiol induzierte 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vermochte in keinem Falle die Reduktion dieser Ketosteroide durchzuführen (Abb. 26).

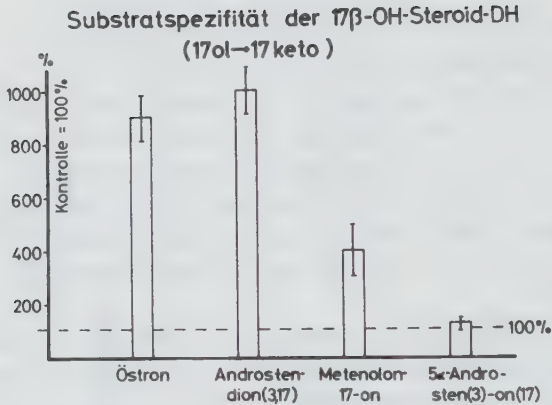


Abb.25 : Substratspezifität der uterinen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase für die Oxydation von 17-Hydroxysteroiden nach Applikation von 1 mg Östradiol/kg Ratte

Ansätze: 16 Stunden nach i.p. Applikation wurden die Tiere getötet und die Uteri entnommen. Je 100 mg Uterusschnitte wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, mit den jeweiligen ^{14}C -markierten Steroiden 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

Östradiol-4- ^{14}C : 0,5 $\mu\text{Mol/l}$

Testosteron-4- ^{14}C : 0,55 $\mu\text{Mol/l}$

Metenolon-1- ^{14}C : 49,5 $\mu\text{Mol/l}$

5 α -Androsten(3)-ol(17)-4- ^{14}C : 0,5 $\mu\text{Mol/l}$

Ordinate: Ausbeute an Oxydationsprodukten in % des Wertes einer nicht vorbehandelten Ratte (= 100%).

n = 2.

Substratspezifität der 17 β -OH-Steroid - DH

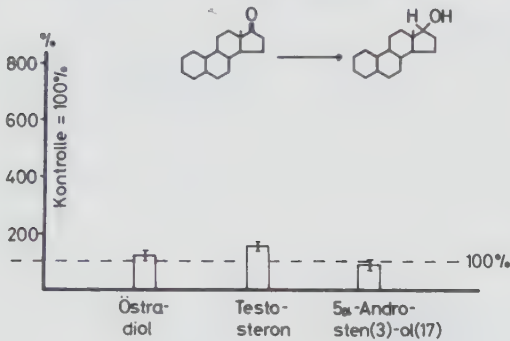


Abb.26 : Substratspezifität der uterinen 17 β -Hydroxy-steroid-Dehydrogenase für die Reduktion von 17-Ketosteroiden nach Applikation von 1 mg Östradiol/kg Ratte

Ansätze: wie unter Abb. 25 beschrieben

Östron-4- ^{14}C : 0,5 $\mu\text{Mol/l}$

Androsten(4)-3,17-dion-4- ^{14}C : 0,4 $\mu\text{Mol/l}$

5 α -Androsten(3)-on(17)-4- ^{14}C : 0,4 $\mu\text{Mol/l}$

Ordinate: Ausbeute an Reduktionsprodukten in % des Wertes einer nicht vorbehandelten Ratte (= 100%).

n = 2.

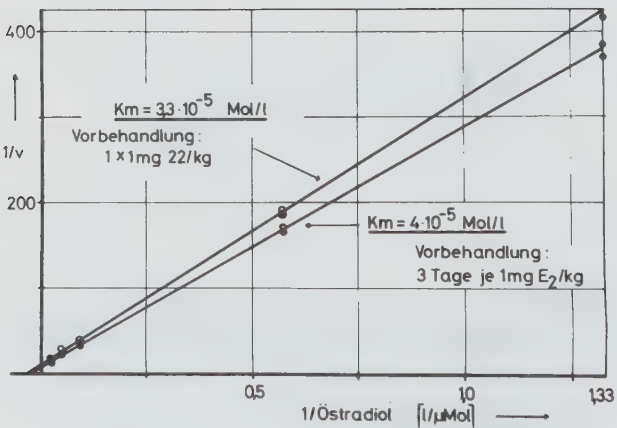
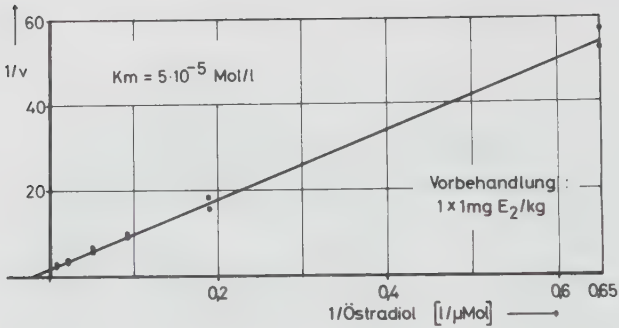


Abb.27 : Bestimmung des K_m -Wertes nach Lineweaver-Burk für Östradiol in Uteri

- nach 16 Stunden einer Injektion von $1 \text{ mg Östradiol/kg}$ Ratte
- nach 16 Stunden einer Injektion von $1 \text{ mg } 5\alpha\text{-Androsten(3)-on(17)/kg}$ Ratte
- nach dreitägiger Vorbehandlung mit je $1 \text{ mg Östradiol/kg}$ Ratte

Ansätze: nach Testanordnung 2 bei 37° C ,
pH 7,4 und 30 Minuten Inkubation
 $n = 2$.

Im Kapitel C.4. wurde die Michaelis-Menten-Konstante für Östradiol im Uterus bestimmt ($K_m = 4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l). Der K_m -Wert änderte sich nicht wesentlich nach Hormonvorbehandlung. 16 Stunden nach einer Injektion von 1 mg Östradiol/kg KG betrug er $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, bei einer 5α -Androsten(3)-on(17)-Vorbehandlung $3,3 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

Nach 3tägiger Vorbehandlung mit je 1 mg Östradiol/kg KG wurde $4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l ermittelt (Abb. 27).

Wird dem Inkubationsansatz neben Östradiol noch 100 μ Mol/l 5α -Androsten(3)-on(17) zugesetzt, so tritt eine nichtkompetitive Hemmung der Reaktion Östradiol zu Östron ein (Abb. 28). Der Zusatz von 5α -Androsten(3)-on(17) vermindert also die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, während der K_m -Wert für Östradiol konstant bleibt.

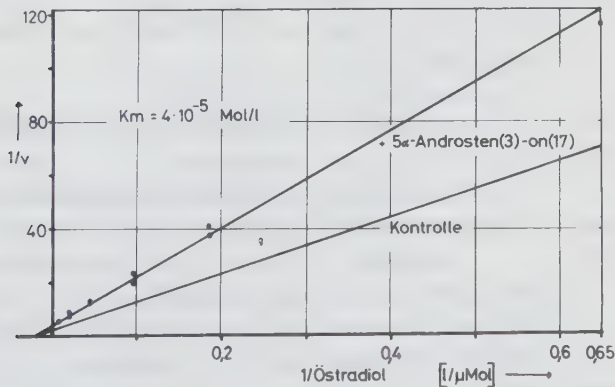


Abb.28 : Bestimmung des K_m -Wertes nach Lineweaver-Burk für Östradiol in Uteri mit Zusatz des Inhibitors 5α -Androsten(3)-on(17)

Ansätze: Je 100 mg Uterusschnitte wurden nach Testanordnung 2 (s. Methodik) bei 37°C und pH 7,4 30 Minuten inkubiert.
Östradiol- $4\text{-}^{14}\text{C}$: 0,5 μ Mol/l
 5α -Androsten(3)-on(17): 100 μ Mol/l
Kontrolle: aus Abb. 18 übernommene K_m -Wert-Bestimmung
 $n = 2$.

C. 7. Gibt es eine Parallelität zwischen Östradiol-oxydation und Tritium-Transfer durch die uterine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase?

Tritiumeinbau in Ketosteroide nach hormonaler Vorbehandlung

Auf Grund der Untersuchungen über den Tritium-Transfer zwischen Östradiol und Androstendionen bzw. 5 α -Androsten(3)-on(17) in Lebermikrosomen und -schnitten wurde vermutet, daß die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die an der Östradioloxydation beteiligt ist, gleichzeitig den Wasserstoff-Transfer bewirkt (Lit. 31, 4).

Da es gelang, die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch Applikation von Östrogenen im Uterus zu induzieren, wurden entsprechende Experimente an diesem Zielorgan durchgeführt.

Zur Untersuchung wurden folgende Redoxpaare verwendet:

Östradiol-17 α -T + Progesteron

(Metabolit: 20 α -Hydroxyprogesteron-20 β -T)

Östradiol-17 α -T + Cortison

(Metabolit: 20 α -Hydroxycortison-20 β -T)

Östradiol-17 α -T + 5 α -Androsten(3)-on(17)

(Metabolit: 5 α -Androsten(3)-ol(17)-17-T)

16 Stunden nach einer Injektion von 1 mg Östradiol/kg KG wurden die Uteri entnommen und mit den betreffenden Ansätzen inkubiert.

Tabelle 5 gibt die experimentellen Befunde wieder. In der letzten Spalte sind die Relationen zur Kontrolle einer unvorbehandelten Ratte aufgeführt. Die Versuchsergebnisse zeigten jedoch keinen entsprechenden Anstieg des Wasserstoff-Transfers nach der Östradiol-Vorbehandlung.

Weder eine 4tägige Vorbehandlung mit je 1 mg Östradiol/kg KG, noch die Verminderung der eingesetzten Donatorkonzentration bewirkten eine verstärkte Metabolitenbildung.

Nur die durch 5 α -Androsten(3)-on(17) induzierte

	nMol Metabolit 60 Min · 100mg	Relation zur Kontrolle
<u>Östradiol-17α-T + Progesteron</u>		
unvorbehandelt (Kontrolle)	$2,4 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$	1,0
Vorbehandlung mit 1mg E ₂ /kg	$2,4 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	1,0
<u>Östradiol-17α-T + Cortison</u>		
unvorbehandelt (Kontrolle)	$8,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	1,0
Vorbehandlung mit 1mg E ₂ /kg	$8,8 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$	1,1
Vorbehandlung mit 1mg E ₂ /kg ⁺)	$8,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$	1,1
Vorbehandlung mit 1mg E ₂ /kg ⁺⁺)	$1,4 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	0,2
Vorbehandlung 4 Tage je 1mg E ₂ /kg	$8,0 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	1,0
<u>Östradiol-17α-T + 5α-Androsten(3)-on(17)</u>		
unvorbehandelt (Kontrolle)	$13,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	1,0
Vorbehandlung mit 1mg E ₂ /kg	$13,5 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$	1,0
Vorbehandlung 4 Tage je 1mg E ₂ /kg	$13,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$	1,0
Vorbehandlung mit 1mg Substanz 22/kg	$33,3 \pm 0,8 \cdot 10^{-3}$	2,4

Tabelle 5: Tritiumeinbau aus Östradiol-17α-T in Ketosteroiden bei Inkubation von Progesteron, Cortison und 5α-Androsten(3)-on(17) in Rattenuteri nach 16 Stunden einer Steroid-Vorbehandlung.

Ansätze: Ein halber Uterus wurde in 4 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 5 Minuten bei Cortison und 15 Minuten bei den anderen Steroiden inkubiert.

Östradiol-17α-T : 0,32 μMol/l

inaktive Steroide : 100 μMol/l

⁺) Östradiol-17α-T : 0,032 μMol/l

⁺⁺) Östradiol-17α-T: 0,0032 μMol/l n = 2.

17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase erhöhte die Wasserstoff-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf 5 α -Androsten(3)-on(17) auf das 2,5fache der Kontrolle, während durch Vorbehandlung mit Östradiol keine verstärkte Reaktion eintrat.

Eine Aktivierung der Wasserstoff-Übertragung in infantilen Rattenuteri konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Tritiumeinbau in Cortison nach Östradiol-Vorbehandlung

Einen weiteren Versuch zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit des durch Östradiol bedingten Aktivitätsanstiegs der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Bezug auf die Östradioloxydation und die Bildung von 20 α -Hydroxycortison gibt Abbildung 29 wieder. Bei diesem Experiment wurde die paarige Anlage des Rattenuterus ausgenutzt. Ein Uterushorn wurde zur Bestimmung der Östradioloxydation, das andere zur Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison verwendet.

Nach Aufarbeitung der Inkubationsansätze wurden die Ausbeuten an Östron und 20 α -Hydroxycortison-20 β -T bestimmt und vergleichend in die Abbildung eingetragen. Auch hier zeigte das induzierte Enzym keine "Wasserstoff-Transfer-Funktion". Der Anstieg der Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase stimmt mit der HTO-Bildung überein, aber die Metabolitenbildung blieb unverändert.

Tritiumeinbau in Progesteron nach hormonaler Vorbehandlung

Da eine direkte Wasserstoff-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Steroide ausgeschlossen ist und die Primärreaktion durch eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase eingeleitet wird, wurde versucht, durch das Akzeptormolekül eine weitere Steroid-Oxydoreduktase anzuregen, die im zweiten Schritt die Tritium-Übertragung verstärkt ausführen sollte. Analog den obigen Versuchsreihen wurde im zweiten Uterushorn die Östradioloxydation verfolgt.

Wie die Tabelle 6 zeigt, findet bei gleichzeitiger Vorbehandlung mit Östradiol und Progesteron keine verstärkte Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Progesteron statt, obwohl durch die Hormongabe die Enzyme

im Uterus induziert worden sind, wie die Östronbildung beweist.

	Vorbehandlung mit:		
	Östradiol	Progesteron	Östradiol und Progesteron
	Tritiumeinbau in % der Kontrolle		
HTO	814%	183%	643%
Metabolit	100%	112%	134%
Östron	845%	167%	678%

Tabelle 6 : Tritiumeinbau aus Östradiol-17 α -T in HTO und 20 α -Hydroxyprogesteron-20 β -T (Metabolit) in Rattenuteri nach 16 Stunden einer i.p. Applikation von Hormonen (je 1 mg/kg KG)

Ansätze: 100 mg Uterusschnitte wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 15 Minuten bei 37^o C inkubiert.

Östradiol-17 α -T: 0,3 μ Mol/l

Progesteron: 100 μ Mol/l

Östradiol-4-¹⁴C: 0,5 μ Mol/l

Die angegebenen Prozentwerte sind auf die Werte einer unvorbehandelten Ratte (= 100%) bezogen.

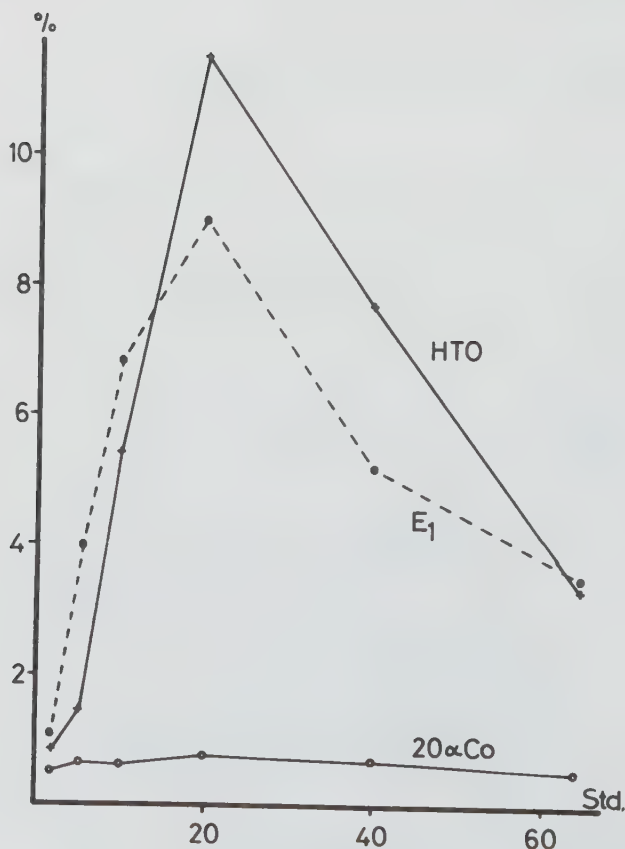


Abb. 29 : Tritiumeinbau aus Östradiol-17 α -T in HTO und 20 α -Hydroxycortison-20 β -T und Östradiol-4- 14 C-Oxydation in Rattenuteri nach einer einmaligen Injektion von 1 mg Östradiol/kg Ratte.

Ansätze: Je 100 mg Uterusschnitte wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 15 Minuten bei 37° C inkubiert.

Östradiol-17 α -T: 0,3 μ Mol/l

Cortison: 100 μ Mol/l

Östradiol-4- 14 C: 0,5 μ Mol/l

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität
n = 2.

C. 8. Tritium-Transfer von Östradiol-17 α -T auf Cortison,
Progesteron und 5 α -Androsten(3)-on(17) in verschie-
denen Organen nach hormonaler Vorbehandlung

Da ein verstärkter Tritium-Transfer trotz Aktivierung der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus nicht nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, in anderen Organen der Ratte eine Reduktion verschiedener Akzeptorsteroidoide durch Östradiol-17 α -T zu beeinflussen.

Es wurde die 4-¹⁴C-Östradioloxydation und die Bildung von 5 α -Androsten(3)-ol(17)-17-T in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit je 5 mg Östradiol bzw. 5 α -Androsten(3)-on(17)/kg KG ermittelt. Zum Vergleich wurden die Werte einer unvorbehandelten Ratte herangezogen. Als Enzymquellen dienten Leber-, Niere- und Ovargewebe weiblicher Ratten.

Zwar wurde in den einzelnen Organen Östradiol verschieden stark oxydiert, dennoch wurde nur ein geringer Anstieg der Östradioloxydation nach Hormongabe gefunden (Abb. 30). Die Vorbehandlung mit Östradiol bzw. 5 α -Androsten(3)-on(17) beeinflusst die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nicht wesentlich. Die HTO- und 5 α -Androsten(3)-ol(17)-17-T-Bildung änderten sich analog der Östradioloxydation ebenfalls nur geringfügig.

Anschließende Untersuchungen mit den Akzeptoren Cortison und Progesteron und der Vorbehandlung mit denselben Steroiden zeigten den gleichen Effekt.

Wichtigstes Ergebnis dieser Versuchsreihe war, daß die Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf verschiedene Akzeptoren in den einzelnen Organen trotz hormonaler Vorbehandlung nicht induzierbar ist. Eine Trennung zwischen Enzymen mit "Wasserstoff-Transfer-Funktion" und solchen mit Substrat-unspezifischen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, die die Oxydoreduktion des Östradiols katalysieren, ist angezeigt.

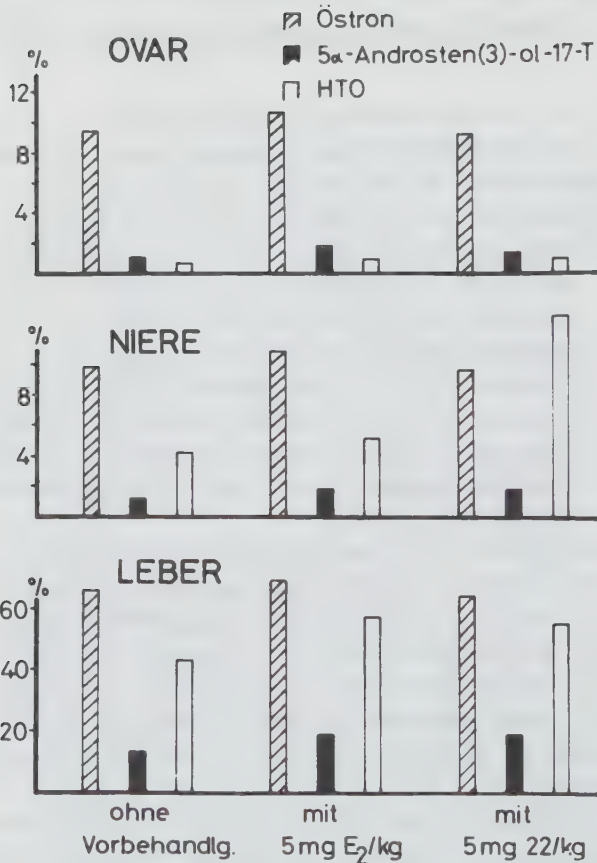


Abb.30 : Tritiumeinbau aus Östradiol-17α-T in HTO und 5α-Androsten(3)-on(17)-17-T in Rattengeweben nach 16 Stunden einer i.p. Applikation von Östradiol bzw. 5α-Androsten(3)-on(17)

Ansätze: 100 mg Gewebe bzw. 1 Ovar wurden in 4,0 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 15 Minuten bei 37° C inkubiert.

Östradiol-17α-T: 0,3 μMol/l

5α-Androsten(3)-on(17): 100 μMol/l

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität

n = 4

D. DISKUSSION

Identifizierung und Stoffwechsel von 20 α -Hydroxycortison

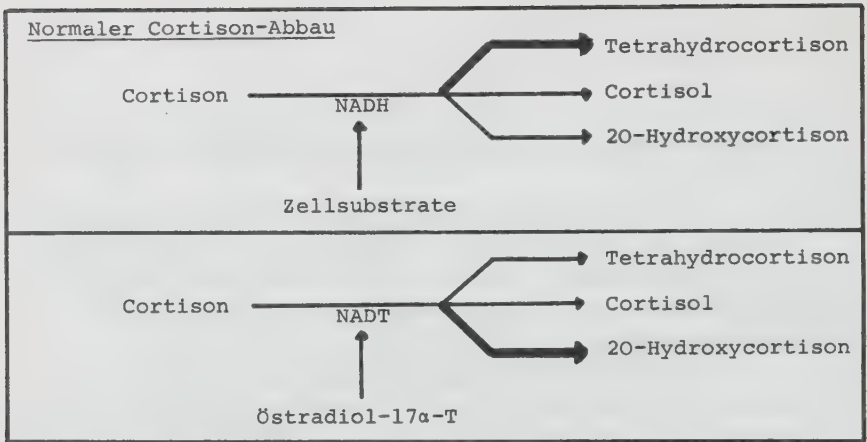
In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß in der Leber männlicher und weiblicher Ratten eine Reduktion des Cortisons zu 20 α -Hydroxycortison durch den vom Östradiol-17 α -T stammenden Wasserstoff stattfindet (Abb. 1).

In einem Inkubationsansatz von 0,5 μ Mol/l Östradiol-17 α -T und 100 μ Mol/l Cortison werden nur maximal 10% der eingesetzten Tritium-Aktivität auf Cortison übertragen (Abb. 7). Nach Wenzel und Mützel (Lit. 4) werden unter den gleichen Bedingungen fast 50% des Östradiol-Wasserstoffs zur Reduktion von 5 α -Androsten(3)-on(17) verbraucht.

Der Tritium-Transfer von Östradiol-17 α -T auf die 20-Ketogruppe ist zehnmal größer als der Einbau bei der Ring A-Reduktion (Abb. 3). Der Austausch von Cortison gegen 20-Hydroxycortison als Akzeptor für die Wasserstoff-Übertragung führt zu keinem vermehrten Tritiumeinbau in Ring A. Da aber die Inaktivierung durch 5 α - und 5 β -Steroidreduktasen der Abbau bestimmende Schritt in der Leber die sowohl quantitativ wie biologisch wichtigste Enzymreaktion ist, scheinen die hier gefundenen Ergebnisse eine neue Möglichkeit der Hormonregulation durch ein anderes Steroid aufzuzeigen (Lit. 106, 19).

Es ist jedoch zu beachten, daß in unseren Inkubationsansätzen die Cortison-Konzentration die physiologische Plasma- bzw. Gewebekonzentration übersteigt.

Da nach Lipman (Lit. 107) durch die Anwesenheit von Östradiol die Hydrierung von Cortison zu Tetrahydrocortison und Tetrahydrocortisol gehemmt wird, d.h. die Δ^4 -5 α -Hydrogenasen werden blockiert, kann nach den obigen Befunden durch das zugeführte Cortison als Ausweichreaktion die Reduktion an der 20-Ketogruppe induziert werden (Schema, unterer Teil):

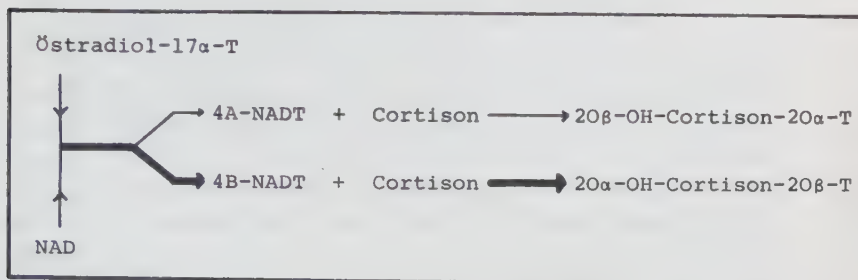


Stereospezifität von 20α-Hydroxycortison

Da in der Leber 20α- und 20β-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen vorkommen, erscheint es unverständlich, daß nur 20α-Hydroxycortison gebildet wird, eine Tatsache, die Langold (Lit. 3) bei der Reduktion von Progesteron durch Östradiol-17α-T ebenfalls beobachten konnte. Da bei Weibchen als auch bei Männchen nur ein Isomeres (20α-Hydroxycortison) auftritt, kann eine Geschlechtsspezifität als Ursache ausgeschlossen werden.

Eine direkte Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Cortison, also ohne Coenzyme, ist nicht möglich, so daß Untersuchungen über die Stereospezifität der enzymatischen Hydrierung durch NAD bzw. NADP die obige Tatsache klären können. Beim NADH bzw. NADPH reagiert entweder das eine oder das andere epimere Wasserstoff-Atom in Position 4 des Nikotinsäureamidrings, welches als A- und als B-Wasserstoffatom bezeichnet wird. Nach Björkholm (Lit. 108, 44) reduziert eine spezifische Δ^4 -5α-Reduktase 7α-Hydroxycholest-4-en-3-on zu 7α-Hydroxy-5α-cholestan-3-on, wobei der Wasserstoff von 4B-NADH 5mal wirksamer ist als die 4A-Form. Folglich müßte auch Cortison ausschließlich durch die B-Form des NADPT bzw. NADT reduziert werden. Daß diese spezifische Reaktion möglich ist, beweisen die Unter-

suchungen von Warren (Lit. 109). Danach entsteht bei der enzymatischen Oxydation von Östradiol-17 α -T mit NAD ausschließlich die 4B-Form des NADT (Lit. 112, 113).



Geschlechtsspezifität

Hinweise auf Geschlechtsunterschiede in der Enzymausstattung in Leberschnitten und -mikrosomen sind bereits in der Literatur zu finden. Hübener und Rubin (Lit. 9, 111) haben Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel beschrieben, die die Hydrierung der Ketogruppe am C-Atom 3, 11 und 20 betreffen.

Die enzymatische Reduktion der 20-Ketogruppe des Cortisons durch die 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenase erfolgt sexualspezifisch. Doch nicht die Stellung des H-Atoms bzw. der OH-Gruppe am C-20-Atom, sondern nur der quantitative Unterschied bei der Bildung von 20 α -Hydroxycortison zeigt geschlechtsspezifische Abhängigkeit. Werden 100 mg Leberhomogenat oder -schnitte mit Östradiol-17 α -T und Cortison 30 Minuten lang inkubiert, so ist in männlichen Tieren die Bildung von 20 α -Hydroxycortison-20 β -T bedeutend größer (dreifach) als bei weiblichen Tieren (Tabelle 2).

Folgende Kriterien könnten für die geschlechtsspezifischen Unterschiede im Ausmaß der Cortison-Hydrierung durch Rattenleberpräparationen verantwortlich sein:

- a) die Cortison-Konzentration in der Zelle,
- b) die Dehydrogenasenaktivität und
- c) die Tritiummenge in Form von NADPT oder NADT.

zu a) Nach Untersuchungen von Schriefers (Lit. 110) übersteigt die Δ^4 -5 α -Reduktase-Aktivität von Mikrosomen weiblicher Ratten die der männlichen um das 8,5fache. Leberschnitte weiblicher Tiere hydrieren aber nur doppelt so viel Cortison am Ring A wie Schnitte von Männchen. Das Substratangebot für eine 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-abhängige Hydrierung von Cortison ist somit in den Zellen von weiblichen Tieren kleiner als bei Männchen, da in ihnen die Inaktivierung zu Tetrahydrocortison pro Zeiteinheit schneller abläuft. Die Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison ist somit in den Leberzellen von männlichen Ratten bevorzugt.

zu b) Nach Angaben von Schriefers beruht der Sexualunterschied auf der Quantität der mikrosomalen Reduktasen, nicht auf einem Unterschied im Angebot der reduzierenden NADP bzw. NAD oder einer Modifikation der Aktivität von Hemmstoffen oder Stimulantia. Wird vorausgesetzt, daß der Tritium-Transfer von der 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenase abhängt, muß die geringere 20 α -Hydroxycortison-Bildung in der weiblichen Ratte auf einer niedrigeren Enzymaktivität beruhen. Hübener und Staib (Lit. 16) wiesen die Existenz dieses bestehenden Geschlechtsunterschiedes bezüglich der Aktivität der 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenase nach. Die 20-Keto-Reduktion in Leberschnitten läuft bei männlichen Tieren schneller ab als bei weiblichen.

zu c) Neben der Enzymaktivität und der Cortison-Konzentration hängt der Umsatz von der Tritiummenge ab, die in Form von NADPT bzw. NADT zur Hydrierung in der Zelle zur Verfügung steht. Die Startreaktion der Tritium-Übertragung ist in jedem Fall die Oxydation des Östradiol-17 α -T zu Östron. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß die NADPT-Konzentration der bestimmende Faktor

bei der sexualspezifischen Cortisonhydrierung durch Östradiol-17 α -T ist, denn die HTO-Bildung - nach 30 Minuten Inkubation - weist noch deutlich auf die geschlechtsabhängige Oxydation des Östrogens hin (Tabelle 2). Ein ausreichend hoher Gehalt an NADPT bzw. NADT scheint in den Zellen vorhanden zu sein.

Die Frage nach dem auslösenden Moment für die quantitativ unterschiedliche Tritium-Übertragung der Geschlechter können erst weitere Untersuchungen beantworten.

Organspezifität

Hinsichtlich der Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison wurden auch deutliche organspezifische Unterschiede gefunden (Abb. 14). Neben der Leber sind Niere, Nebenniere, Diaphragma, Ovar, Uterus, Hoden und Prostata Organe des spezifischen Wasserstoff-Transfers. Jedoch läuft der Wasserstoff-Transfer in diesen Organen in so geringem Umfang ab, daß er mengenmäßig bei der Inaktivierung der Nebennierenrindenhormone kaum eine Rolle spielt.

Obwohl der Hoden als Steroid-produzierendes Organ über eine hohe 17 β -Steroid-Dehydrogenase-Aktivität verfügt, sind auch hier nur geringe Tritium-markierte Cortison-Derivate auffindbar (Abb. 14). Wie schon erwähnt, ist möglicherweise nicht die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, sondern die der 20-Keto-Dehydrogenase für den quantitativen Reaktionsverlauf der Cortisonhydrierung durch Östradiol-17 α -T verantwortlich.

Entgegen den Befunden von Wiest (Lit. 104), daß im Uterus keine 20-Steroid-Dehydrogenase vorhanden sei, erfolgt auch im Uterus ein Cortisonabbau zu 20 α -Hydroxycortison (Abb. 14). Nach neueren Untersuchungen (Lit. 93) ist die 20-Keto-Oxydoreduktase in allen Sexualorganen am Abbau von Progesteron zu 20 α -Hydroxyprogesteron nachgewiesen worden.

Nach Jensen (Lit. 10) soll Östradiol nur in den Stoffwechselorganen, nicht aber in dem Erfolgsorgan in Östron umgewandelt werden. Der geringe, aber meßbare Tritium-Transfer im Uterus muß aber durch eine enzymatische Östradioloxydation eingeleitet worden sein. Es wurde daher versucht, diese Oxydation durch Inkubationen mit Östradiol-2,4,6,7-T in verschiedenen Cyclusstadien nachzuweisen. Dabei zeigte sich das Maximum der Östronbildung am 1. Östrus-Tag, das Minimum im Proöstrus (Abb. 17).

Erstaunlicherweise wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von 100 $\mu\text{Mol/l}$ Cortison der Abbau des Östradiols gehemmt, obwohl man aus den analogen Leberversuchen annehmen sollte, daß der Östradiol-Wasserstoff verstärkt zur Reduktion des Cortisons verbraucht und damit mehr Östron gebildet wird.

Induktion der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Die Zunahme der Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus wird durch die Erhöhung der Konzentration von Östradiol im Organismus ausgelöst. 5 Stunden nach Gabe von 1 mg Östradiol/kg Körpergewicht findet man im Uterus einen Anstieg der Aktivität des Enzyms auf etwa das vierfache des Kontrollwertes vor Hormongabe, 16 Stunden nach Hormongabe auf etwa das neunfache (Abb. 21).

Die niedrigste Dosis, welche 16 Stunden nach Applikation des Hormons die Dehydrogenase des Uterus induziert, beträgt 10 γ (Abb. 20). Durch tägliche Applikation von 1 mg Östradiol/kg Körpergewicht erreicht die Aktivität 96 Stunden nach Beginn der Behandlung mit dem 25fachen des Normalwertes ein Maximum (Abb. 22).

Da der Anstieg der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase außer durch Östradiol, auch durch das Nichtsteroid Diäthylstilböstrol hervorgerufen wird, nicht aber durch Androgene oder Gestagene, kann daraus geschlossen werden, daß die Enzyminduktion im Uterus östrogen spezifisch ist. (Tabelle 4)

Während die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in den Stoffwechselorganen Leber und Niere auch bei höherer Hormongabe konstant blieb, findet durch die hohe Östradiol-Konzentration im Organismus eine beschleunigte Östradioloxydation im Uterus statt. Es ist also möglich, daß eine Kontrolle der Hormonwirkung durch eine Inaktivierung des Hormons mittels der Dehydrogenase im Erfolgsorgan selbst erfolgt, wie es Kinson und Kochakian (Lit. 18) für die Erfolgsorgane der Androgene durch die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase diskutieren. Diese Kontrollfunktion wird durch die Angaben von Breuer (Lit. 91) unterstützt. Er zeigte, daß die Oxydation des Östradiols während der Phase der Hormonunabhängigkeit verloren geht.

Wie die Änderung der Östradiol-Konzentration im Uterus gesteuert wird, kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden.

Jensen (Lit. 10) diskutiert die Möglichkeit einer Regulation durch intrazelluläre Konzentration an wirksamem Östradiol. Nach Angaben von Jung (Lit. 43, 48) soll die Kontrollfunktion in der Verringerung des Membranpotentials an Myometriumzellen bestehen.

Erhöhung der Östradiol-Konzentration
im Uterus ergibt:

1. Proteinbiosynthese (Lit. 45)
(Messung: Proteingehalt d. U., nicht geprüft)
2. Vermehrte Synthese von 17 β -OH-Steroid-DH
(Prüfung mit Actinomycin D)
3. Aktivitätssteigerung der 17 β -OH-Steroid-DH
(Messung: 17-OH-Steroide $\longrightarrow$ 17-Keto-Steroide)
4. Beschleunigte Östradioloxydation
(Messung: 4-¹⁴C-Östradiol $\longrightarrow$ 4-¹⁴C-Östron)

Der durch Östradiol induzierten Proteinsynthese geht die Aktivierung der RNS-Polymerasen und die Steigerung der Ribonucleinsäuresynthese voraus. Mit Actinomycin D kann nun geprüft werden, ob der Aktivitätsanstieg der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase auf eine vermehrte Enzymsynthese beruht, da das Actinomycin D sekundär die Proteinsynthese durch Hemmung der RNS-Polymerasen blockiert.

Durch die gleichzeitige Applikation mit dem Antibiotikum wird die Östradioloxydation gehemmt (Abb. 23). 16 Stunden nach der Hormongabe tritt gegenüber der Kontrolle einer unvorbehandelten Ratte keine verstärkte Östradioloxydation ein. Es ist also wahrscheinlich, daß der Aktivitätsanstieg der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase auf einer vermehrten Enzymsynthese beruht.

Die Hemmung der uterotrophen Wirkung des Hormons durch Actinomycin D hat aber keinen Einfluß auf die Retentionsfähigkeit des Rattenuterus für Östradiol (Lit. 73). Nach Duncan (Lit. 66) wird sie aber durch Upjohn 11-100 konkurrierend aufgehoben. Östradiol kann am Uterus seine Wirkung nicht mehr entfalten. Die Hormon-Rezeptor-Hypothese, die die Bindung des Östradiols an einen spezifischen Rezeptor fordert, wird durch die Hemmung der Enzyminduktion bei gleichzeitiger Gabe von Östradiol und dem Antiöstrogen Upjohn 11-100 unterstützt. Eine verstärkte Oxydation Östradiol zu Östron im Inkubationsgemisch wurde nicht ermittelt (Abb. 23).

Induktion der 17 β -OH-Steroid-DH durch 5 α -Androsten(3)-on(17)

Folgende Effekte des 5 α -Androsten(3)-on(17) am Uterus sind zu unterscheiden:

1. Steigerung der 17 β -OH-Steroid-Dehydrogenase-Aktivität

Neben Östradiol und Stilböstrol ruft 5 α -Androsten(3)-on(17) einen Aktivitätsanstieg der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase hervor (Tabelle 4). Analog Östradiol ist die Enzyminduktion von der applizierten Dosis abhängig (Abb. 20). Auch die Dauer der Steroidwirkung deutet

auf ein "östrogenes" Verhalten hin. Das Maximum einer 5α -Androsten(3)-on(17)-Vorbehandlung liegt hier bei 16 Stunden und nimmt wie Östradiol mit der Zeit ab (Abb. 21). Die Enzyminduktion durch 5α -Androsten(3)-on(17) wird bei gleichzeitiger Gabe mit Actinomycin D gehemmt.

Eine Zusammenstellung der physiologischen Wirkung (= Uterus-Wachstum) und 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität gibt folgende Tabelle wieder:

	Uterus- Wachstum	17β -Steroid-De- hydrogenase-Ak- tivität
Vorbehandlung mit:		
E_2	+	+
D	+	+
5α -Androsten(3)-on(17)	-	+
E_2 + Upjohn	-	-
D + Upjohn	-	-
5α -Androst. + Upjohn	nicht geprüft	+
E_2 + Actinomycin	-	-
D + Actinomycin	-	-
5α -Andr. + Actinomycin	nicht geprüft	-
E_2 = Östradiol D = Diäthylstilböstrol		

Die Vermutung, daß 5α -Androsten(3)-on(17) Östrogen wirksam ist, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Trotz Mehrfachversuche im Mäuse-Uterus-Test blieb ein Uterus-Wachstum aus (Lit. 58).

2. Rezeptor-Unabhängigkeit

Aus der obigen Tabelle läßt sich weiterhin entnehmen, daß das Antiöstrogen Upjohn 11-100 die durch 5α -Androsten(3)-on(17) stimulierte Enzymaktivierung nicht blockiert: Östradiol wird unabhängig vom Upjohn 11-100 gleichermaßen stark zu Östron oxydiert (Abb. 23). Dies

weist daraufhin, daß 5α -Androsten(3)-on(17) eine Aktivitätssteigerung der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase unter Ausschaltung der Östradiol-Rezeptoren im Uterus hervorruft.

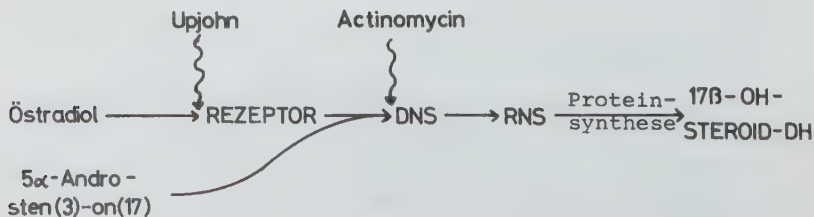
3. Nichtkompetitive Hemmung der 17β -OH-Steroid-DH

5α -Androsten(3)-on(17) bewirkt eine Verminderung der maximalen Geschwindigkeit (der Reaktion Östradiol zu Östron) bei gleichbleibender Michaelis-Menten-Konstante (Abb. 28).

4. Konkurrenz mit Östradiol am Rezeptor

Bei der Vorbehandlung mit 5α -Androsten(3)-on(17) in einer Kombination mit einer Östrogenen Komponente (Östradiol bzw. Diäthylstilböstrol) wird durch das Androgen die Einzelwirkung von Östradiol gehemmt, die Östradiol-Dehydrogenase-Aktivität wird um 20% gesenkt. Der Effekt ist mit Stilböstrol noch deutlicher ausgeprägt, da die Enzymaktivität um die Hälfte vermindert wird. Bei einem Zusatz von Upjohn 11-100 wird die Aktivität noch weiter unterdrückt, die spezifische Enzyminduktion des 5α -Androsten(3)-on(17) bleibt in jedem Falle erhalten (Abb. 24).

Da die K_m -Wert-Bestimmungen nach Vorbehandlung mit Östradiol und 5α -Androsten(3)-on(17) innerhalb der Fehlergrenze einer solchen Methode keinen Unterschied zeigen (was zwar nicht als Beweis, aber als Hinweis auf die Anwesenheit einer einzigen 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase anzusehen ist), kann man die Östradiol- und 5α -Androsten(3)-on(17)-Wirkung an Hand folgender Zeichnung zusammenfassend verdeutlichen:



Substratspezifität der 17 β -OH-Steroid-DH im Rattenuterus

Anschließend soll in diesem Zusammenhang noch auf die Versuche der Substratspezifität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus hingewiesen werden. Die 17-Hydroxysteroid-Östradiol und Testosteron werden nach Aktivitätssteigerung der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase um das 10fache gegenüber der Kontrolle oxydiert, Metenolon nur um das 4fache (Abb. 25). Die Tatsache, daß 5 α -Androsten(3)-ol(17) durch das Enzym nicht angegriffen wird, spricht für eine deutliche Gruppenspezifität der uterinen Dehydrogenase. Wohl besitzt das Steroid eine 17-Hydroxygruppe, aber im Gegensatz zu den obigen Hormonen keine Sauerstoff-Funktion am Ring A. Eine verstärkte Reduktion der 17-Keto- zu 17-Hydroxysteroiden konnte trotz Enzymaktivierung nicht erreicht werden (Abb. 26). Möglicherweise ist dies auf eine zu geringe Menge an reduzierten Wasserstoff-übertragenden Coenzymen im Uterus zurück zu führen.

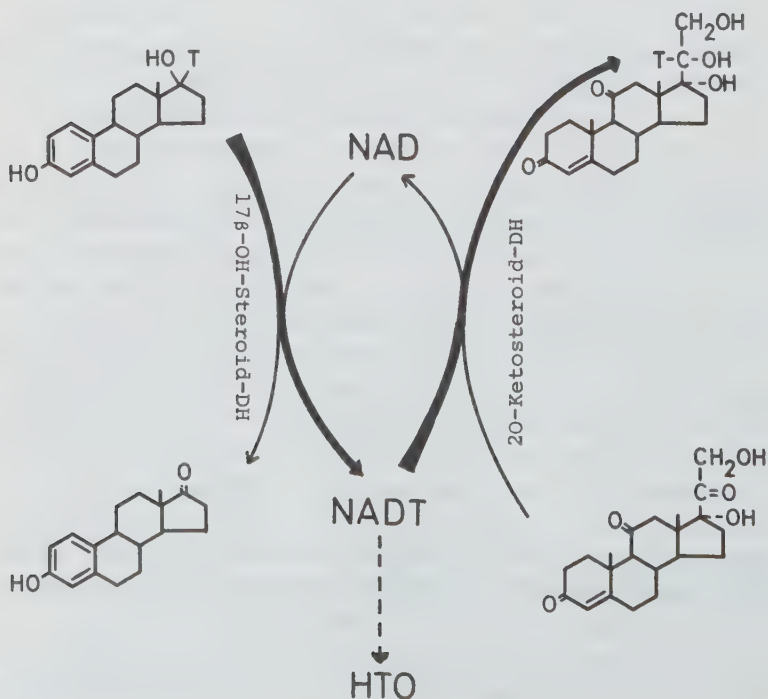
Beziehung zwischen T-Transfer und "transferrierenden" Enzymen

Untersuchungen der Enzymkinetik beweisen eindeutig, daß Enzyme oder Enzymsysteme vorhanden sind, die sich an der Tritium-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison beteiligen. Das pH-Optimum des Tritium-Transfers auf Cortison liegt bei 7,3 (Abb. 5). Die temperaturabhängige Reaktion erreicht bei 37° C ein Maximum (Abb. 6). Die Abhängigkeit des Umsatzes von der Konzentration des Substrats ist in Form der Lineweaver-Burk-Transformation in Abbildung 10b dargestellt. Bei einem pH-Wert von 7,4 beträgt der Km-Wert für Cortison $2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l. Die Geschlechts- und Organspezifität sind weitere Charakteristika, die auf das Vorhandensein einer Enzymreaktion hindeuten (Tabelle 2, Abb. 14). Die Coenzym-Abhängigkeit einer Tritium-Übertragung wurde von anderen Autoren beschrieben. Nur in Anwesenheit von Pyridinnukleotiden (NAD, NADP) überträgt Östradiol-17 α -T sein Tritium auf Androstendion (Lit. 40).

Zwangsläufig stellt sich die Frage, ob die Enzyme, die die Inaktivierung des Östradiols bzw. des Nebennieren-

rindenhormons katalysieren, identisch sind mit denen, die auch den Tritium-Transfer bewirken.

Die Startreaktion wird durch die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase eingeleitet. Östradiol- 17α -T wird zu Östron oxydiert und das abgespaltene Tritium-hydridion von den Pyridinnukleotiden übernommen. Dieser Enzymschritt wird durch die Versuche am Uterus bestätigt. Nach östrogener Vorbehandlung wird durch die induzierte Dehydrogenase Östradiol-4- ^{14}C achtfach verstärkt oxydiert. Im zweiten Schritt kann das NADT (bzw. NADPT) sein Tritium in unspezifischer Reaktion in den Stoffwechsel einschleusen und schließlich zu HTO abbauen, oder sich z.B. an Steroidhydrierungen beteiligen. Eine Steroidreduktion durch Pyridinnukleotide ohne Enzyme ist aber nicht möglich, so daß z.B. zur Reduktion der 20-Ketogruppe von Cortison die 20-Hydroxysteroid-Dehydrogenase beteiligt sein muß:



Nach Wenzel und Mützel (Lit. 4) gibt es auch einen Tritium-Transfer auf 17-Ketosteroide. Entsprechend der obigen Hypothese muß die 5α -Androsten(3)-on(17)-Reduktion durch NADT durch die gleiche 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysiert werden, die auch an der Östradiol- 17α -T-Oxydation beteiligt ist. Eine Aktivitätssteigerung dieser 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus durch Vorbehandlung mit Östradiol konnte gezeigt werden. Die Ausbeuten von 5α -Androsten(3)-ol(17)-T in Relation zur Kontrolle widerlegen scheinbar die obige Behauptung, da die Tritium-markierten Reduktionsprodukte nicht in demselben Verhältnis wie Östron gebildet worden sind (Tabelle 5). Es wurde jedoch gezeigt, daß eine verstärkte Reduktion von 17-Ketoverbindungen zu 17-Alkoholen nicht eintrat, so daß das Ausmaß der Tritium-Übertragung von Östradiol- 17α -T auf 5α -Androsten(3)-on(17) nicht wesentlich geändert werden kann. Erst wenn es möglich ist, 20-Keto-Oxydoreduktasen und 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen im Organismus zu induzieren, kann der eindeutige Identitätsbeweis geführt werden, daß die abbauenden Enzyme gleichzeitig für die Tritium-Übertragung verantwortlich sind.

Hat die spezifische T-Übertragung zwischen Cortison und Östradiol eine Bedeutung?

Eine biologische Wechselwirkung scheint im Uterus ohne Bedeutung zu sein. So zeigen die Versuche im Uterus, daß maximal 1% der eingesetzten Tritium-Aktivität an der Reduktion des Cortisons beteiligt ist (Abb. 14). Ein anderes Bild liefern aber die Experimente in der Leber. Hier können Östradioloxydationen die Reduktionen des Nebennierenrindenhormons beeinflussen und damit möglicherweise die biologische Wirkung des Steroids steuern. Die Versuche zur Klärung der Spezifität des Wasserstoff-Transfers in Homogenat und Schnitten von Rattenlebern zeigten, daß die Reduktion des Cortisons allein vom Konzentrationsverhältnis Donator : Akzeptor abhängig ist. Bei einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l Östradiol stammen 90% der

Reduktionsäquivalente im Nebennierenrindenhormon vom Östradiol-17 α -T (Abb. 11). Es ist also durchaus denkbar, daß bei niedrigerer Hormonkonzentration in den Leberzellen Östradiol den Cortisonabbau regulieren kann und somit bei der biologischen Halbwertszeit mitbestimmend ist.

Einen ersten Hinweis auf die Bedeutung des Östradiols im Cortisonhaushalt liefern die Beobachtungen von Yates und Glenister (Lit. 41). Eine signifikant niedrige Plasma-Corticosteroidkonzentration in männlichen Ratten steht im engen Verhältnis mit einer größeren Halbwertszeit, im Gegensatz zu weiblichen Ratten.

Bei der Therapie mit Nebennierenrindenhormonen muß auf mögliche Nebenwirkungen geachtet werden. Zahlreiche Nebeneffekte sind in der Literatur beschrieben. Ob aber der Östradiolstoffwechsel durch diese Hormontherapie beeinflusbar ist, ist wenig bekannt. 1969 beschrieben Morrison und Kilpatrick (Lit. 42) eine solche Korrelation. Sie fanden eine erniedrigte Östriolausscheidung im Harn schwangerer Frauen unter Prednison-Therapie und diskutierten einen direkten Einfluß des Prednisons auf die Placenta-Enzyme. Auf Grund der dargelegten Versuchsergebnisse scheint es möglich, daß der Östradiolabbau in einer einfachen biochemischen Oxydoreduktion zwischen Östradiol und Prednison liegt, wie es an Hand von Cortison-Versuchen gezeigt wurde, und daß damit die Konzentration des Östradiols in Zellen rasch absinkt, und die Hydroxylierung zu Östriol verringert wird.

Welche Bedeutung dieser Beobachtung zukommt, kann heute noch nicht beurteilt werden.

E. MATERIAL UND METHODIK

1. Material

1. Tiere

Als Versuchstiere wurden ausgewachsene, weibliche und männliche Wistarratten eigener Zucht verwendet (150-300 g schwer, 8-16 Wochen alt). Sie erhielten eine Standardkost (Altromin R) und Trinkwasser ad libitum. Infantile Ratten (21-25 Tage alt, 30-40g schwer) wurden von der Fa. Bäumler, Wolfratshausen, bezogen.

2. Steroide

Die inaktiven Steroide waren Handelspräparate der Fa. Schering, Berlin, und der Fa. Merck, Darmstadt. Alle Steroide wurden dünn-schichtchromatographisch auf chemische und radiochemische Reinheit geprüft. Die in dieser Arbeit verwendeten Steroide und ihre interne Bezeichnung zeigt folgende Tabelle:

Steroide	Bezeichnung
Cortison (4-Pregnen-17 α ,21-diol-3,11,20-trion)	Co
Tetrahydrocortison (Pregnan-3 α ,17 α ,21-triol-11,20-dion)	Te
Cortolon (Pregnan-3 α ,17 α ,20,21-tetrol-11-on)	CL
Progesteron (4-Pregnen-3,20-dion)	Pro
20-Hydroxyprogesteron (4-Pregnen-20 α , -ol-3-on)	20 α -Pro
Androstendion (4-Androsten-3,17-dion)	An-di
Testosteron (4-Androsten-17 β -ol-3-on)	Test

Steroid	Bezeichnung
5 α -Androstenon (5 α -Androsten(3)-on(17))	22
Östradiol (Östra-1,3,5-trien-3,17 β -diol)	E ₂
Östron (Östra-1,3,5-trien-3-ol-17-on)	E ₁
Metenolon (1-Androsten-1-methyl-17 β -ol-3-on)	Me
Androstenon (4-Androsten-3-on)	
5 α -Androstenol (5 α -Androsten(3)-ol(17))	22-ol
Darstellung von <u>4-Pregnen-17α,20α,21-triol-3,11-dion</u> (20 α Co)	

Nach Norymberski und Woods (Lit. 39) wurden 200mg Cortisonacetat, gelöst in 50ml Methanol, mit 20mg Natriumborhydrid bei 0° C geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum stark eingeeengt, mit Wasser gewaschen, mit Salzsäure angesäuert und mit Chloroform extrahiert. Der Trockenextrakt wird mit alkoholischer Kalilauge verseift. Das freie 20 α -Hydroxycortison wird umkristallisiert und zur Abtrennung von 20 β - mit NAD und 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase behandelt.

Die radioaktiv markierten Steroide hatten folgende spezifische Aktivitäten:

Östradiol-17 α -T	56 μ Ci/ μ Mol	Radiochemical Centre
	2500 μ Ci/ μ Mol	Radiochemical Centre
Östradiol-2,4,6,7-T	3000 μ Ci/ μ Mol	Radiochemical Centre
Östradiol-6,7-T	39700 μ Ci/ μ Mol	NEN
Metenolon-17 α -T	3080 μ Ci/ μ Mol	Schering
Östradiol-4- ¹⁴ C	58 μ Ci/ μ Mol	Radiochemical Centre
Östron-4- ¹⁴ C	51 μ Ci/ μ Mol	NEN
Metenolon-1- ¹⁴ C	0,3 μ Ci/ μ Mol	Schering
Cortison-4- ¹⁴ C	57 μ Ci/ μ Mol	Radiochemical Centre
Testosteron-4- ¹⁴ C	58 μ Ci/ μ Mol	Radiochemical Centre
Androstendion-4- ¹⁴ C	56 μ Ci/ μ Mol	Radiochemical Centre

Die Herstellung von 5 α -Androsten(3)-on(17)-4-¹⁴C erfolgt nach einem Verfahren von Mc. Kenna et al. (Lit. 17).

0,15mg (= 25 μ Ci) Androstendion-4-¹⁴C werden in 5 ml 50% kochender Essigsäure gelöst. Nach Zugabe von 0,6g Zinkstaub -in vier gleichen Portionen in Abständen von 15 Minuten zugesetzt- wird dieses Suspensionsgemisch 30 Minuten am Rückflußkühler gekocht.

Der Zinkstaub wird abfiltriert und mit 1 ml Eisessig nachgewaschen. Dem Filtrat wird etwas Eis zugesetzt. Mit Natronlauge wird die Lösung auf pH 6 eingestellt und schließlich mit Äther erschöpfend extrahiert. Die eingedampfte organische Phase wird dünnschichtchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 20%

spezifische Aktivität: 58 μ Ci/ μ Mol

Zur Herstellung von 5 α -Androsten(3)-ol(17)-4-¹⁴C werden 2,5 μ Ci 5 α -Androsten(3)-on(17)-4-¹⁴C in 5 ml wasserfreiem Methanol gelöst. Nach Zugabe von 10 mg Natriumborhydrid (p.a. Merck) wird die Lösung 1 Stunde bei Zimmertemperatur unter öfterem Umschütteln stehen gelassen. Der Cyclohexanextrakt wird eingengt und dünnschichtchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 80%

spezifische Aktivität: 58 μ Ci/ μ Mol

3. Reagentien, Enzyme und Lösungsmittel

Alle Reagentien hatten, wenn nichts anderes angegeben, den Reinheitsgrad "reinst". Die organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und vor Licht geschützt aufbewahrt. Die Szintillationschemikalien waren Originalsubstanzen der Fa. Beckman Inc.

NAD, NADH und die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase stammten von der Fa. C.F. Boehringer, Mannheim.

Diäthylstilböstrol lieferte die Fa. Gayer, Berlin. Actinomycin D lieferte die Fa. Serva, Heidelberg.

Das Antiöstrogen Upjohn 11-100 A (1-(2-(p-(3,4-Dihydro-6-methoxy-2-phenyl-1-naphthyl)phenoxy)äthyl)pyrolidin-hydrochlorid) war ein Geschenk der "The Upjohn Comp.", Kalamazoo, Mich., USA.

4. Injektionslösungen

Die Verbindungen wurden in 90% äthanolischer Lösung gelöst. Zur besseren Verträglichkeit wurde Upjohn in 50 Vol-% äthanolischer 0,9% Kochsalzlösung keimfrei zubereitet. Die Injektionslösungen wurden bei -20°C vor Licht geschützt aufbewahrt.

2. Methodik

A. Gewebe

Testanordnung_1

Die Tiere wurden nach Narkotisierung mit Chloroform durch Genickschlag getötet. Nach dem Ausbluten wurden die Organe zur Gewinnung von Schnitten bzw. Homogenaten entnommen und sofort in entsprechende, eiskalte Pufferlösung gelegt.

Leberschnitte wurden nach der Methode von Deutsch (1936) hergestellt. Die auf einem Eisblock angefrorenen Organe wurden in 0,5 mm dünne Scheiben geschnitten und sofort in Ringer-Phosphat-Puffer überführt.

Zur Homogenatherstellung wurde pro Inkubationsansatz 100 mg Lebergewebe zerkleinert und in 1 ml Tris-HCl-Puffer unter Eiskühlung mit einem Potter-Homogenisator bei 400 U/Min homogenisiert. Dem Homogenat wurden weitere 3 ml Tris-HCl-Puffer pro Ansatz zugesetzt.

Zur Bestimmung der Organspezifität wurden den Tieren auch Niere, Nebenniere, Diaphragma, Ovar, Hoden, Prostata und Uterus entnommen. Die Niere wurde mit der Rasierklinge in Scheiben geschnitten, die anderen Organe mit der Schere zerkleinert. Die Ovarien und Nebennieren wurden nach Entfernung von Fett und Bindegewebe zerkleinert und mit einem Spatel zerdrückt, der so gewonnene Gewebepulver zur Inkubation verwendet. Die Bindegewebsschicht am Uterus wurde mit der Pinzette abgezogen, die beiden Uterushörner wurden der Länge nach gespalten.

Die Zeit zwischen dem Töten der Tiere und dem Inkubationsbeginn betrug nicht mehr als 15 Minuten.

Testanordnung_2

Den getöteten Rattenweibchen wurde der Uterus sofort entnommen. Anhaftendes Fett und Bindegewebe wurden entfernt, der Uterus am Ansatz des Mesosalpinx der Länge nach gespalten und mit der Schere zerkleinert. Pro Uterushorn werden 0,5 ml der Lösung nach Jarabak (Lit. 24) zugesetzt und unter Eiskühlung mit einem Atomixmill (Fa. G. Lahl, Müllheim) homogenisiert. Für einen Inkubationsansatz werden 0,5 ml dieses Homogenats benötigt und mit 3,5 ml Tris-HCl-Puffer verdünnt.

B. Inkubationsbedingungen

Die in 0,1 ml Äthanol gelösten inaktiven und radioaktiven Steroide wurden in 4 ml Puffer mit dem eingesetzten Gewebe bzw. Homogenat in Warburggefäßen unter Luftzutritt im Warburg'schen Schüttelthermostaten bei 37° C geschüttelt. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Inkubationszeit 30 Minuten. Der Inkubationsstart ist das Einbringen der Gläschen in den schon vorgewärmten Schüttelthermostaten. Das Gesamtvolumen der Lösung betrug 4,1 bzw. 4,2 ml.

Die widersprüchlichen Angaben über die optimale Zusammensetzung einer Pufferlösung für Gewebeeinkubationen wurden an Hand zweier Reaktionen nachgeprüft:

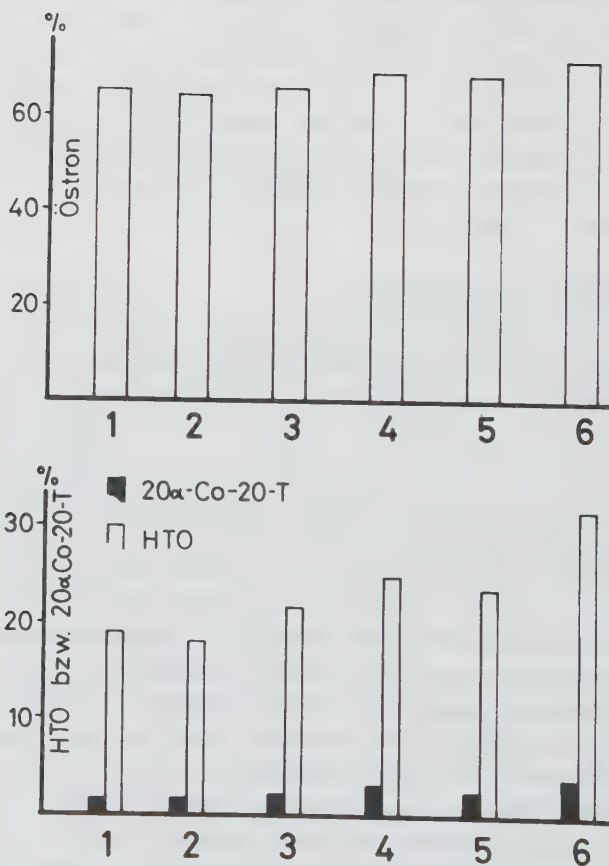
- a. die Oxydation von Östradiol-4-¹⁴C zu Östron-4-¹⁴C und
- b. die T-Übertragung von Östradiol-17 α -T auf Cortison.

Die untersuchten Puffergemische waren:

1. Borax-phosphat nach Kolthoff (Lit. 25)
2. Citrat-Phosphat-Borat nach Teorell (Lit. 26)
3. Citronensäure-Phosphat nach Mac Ilvaine (Lit. 27)
4. Phosphat nach Sörensen (Lit. 28)
5. Tris-HCl nach Gomori (Lit. 29)
6. Ringer-Phosphat nach Stauffer (Lit. 30)

(Die Zahlen der Zeichnung sind identisch mit der Reihenfolge der obigen Angaben).

Die Abbildung gibt im oberen Teil die gebildete Östronmenge in % der eingesetzten Östradiolmenge wieder, im unteren Teil werden die HTO- und Metabolitenbildung (4-Pregnen-17 α ,20 α ,21-triol-3,11-dion-20 β -T) verglichen. Die Ringer-Phosphat-Lösung nach Stauffer lieferte für



Abhängigkeit des Tritiumeinbaues in HTO und 4-Pregnen-17α,20α,21-triol-3,11-dion-208-T und der Oxydation von Östradiol-4-¹⁴C von der Zusammensetzung verschiedener Puffer.

oben: 100 mg weibl. Rattenleber wurden in 4 ml des betreffenden Puffers, pH 7,4, mit 0,52 μMol/l Östradiol-4-¹⁴C 15 Minuten bei 37° C inkubiert.

unten: 100 mg weibl. Rattenleber wurden in 4 ml des betreffenden Puffers, pH 7,4, mit 0,32 μMol/l Östradiol-17α-T und 50 μMol/l Cortison 5 Minuten bei 37° C inkubiert.
(Puffergemische 1-6: siehe Text)

beide Reaktionen die höchsten Ausbeuten, die physiologischen Zustände werden hier am wenigsten gestört.

C. Aufarbeitung der Versuchsansätze

Die Reaktionen wurden durch sofortiges Einbringen der Warburggefäße in Eis-Wasser unterbrochen. Der gesamte Inhalt wurde in Zentrifugiergläschen überführt. Zum Nachspülen wurden 3 ml Chloroform verwendet, das wiederum zum Extrahieren des Ansatzes benutzt wurde. Nach kräftigem Schütteln wurde 5 Minuten bei 4000 U/Min. zentrifugiert und das Chloroform mit einer Pipette abgehebert. Spülen und Extrahieren wurden dreimal wiederholt. Zur Gewinnung der Steroide aus den eingesetzten Geweben wurde der Überstand abzentrifugiert, die Gewebe homogenisiert und viermal mit 3 ml Aceton extrahiert. Der Aceton- und Chloroformextrakt wurden vereinigt und im Druckluftstrom bei leichter Erwärmung bis 40° C auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft. HTO wurde nach Alkalisieren der Überstände durch Gefrierdestillation gewonnen.

D. Dünnschichtchromatographie

Die zur Trockene eingedampften Gewebsextrakte wurden dreimal mit je 0,1 ml Aceton auf eine 0,25 mm dicke, nicht aktivierte DC-Fertigplatte (Kieselgel F 254, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Chromatogramme wurden aufsteigend in folgenden Systemen entwickelt (jeweils Kammersättigung und Zimmertemperatur) :

- | | |
|------------------------------|-----------------------|
| 1. Chloroform/Aceton | 90 : 10 |
| 2. Chloroform/Äthanol/Wasser | 174: 26 : 1 (Lit. 15) |
| 3. Chloroform/Aceton | 10 : 30 |
| 4. Aceton/Methanol/Wasser | 100: 10 : 1 |
| 5. Äther/Dimethylformamid | 99 : 1 |

Die Angaben über Zusammensetzung der Fließmittel beziehen sich auf Volumenteile. In einigen Fällen wurde zur besseren Trennung im offenen System (Verdunsten des Fließmittels vom freien Ende der DC-Platte) aufsteigend entwickelt.

E. Identifizierung der Metabolite

Die Lagebestimmung von radioaktiven Metaboliten erfolgte durch direkte Aktivitätsmessung mit dem "DC-Scanner II" in Verbindung mit dem "Autochronschreiber" (Fa. Prof. Bertold, Wildbad, Lit. 31) oder durch die gleichzeitig aufgetragenen, inaktiven Referenzsubstanzen. Sie wurden entweder im UV-Licht sichtbar gemacht oder durch Ansprühen der DC-Platte mit äthanolischer Schwefelsäure (96% Äthanol/ H_2SO_4 konz. 1:1) oder mit Antimontrichlorid/Eisessig 1:1. Zur weiteren Identifizierung der Steroide wurden mikrochemische Untersuchungen durchgeführt:

Zur Acetylierung wurde die getrocknete Substanz in einem Tropfen wasserfreiem Benzol gelöst und mit 0,05 ml Acetanhydrid und 0,05 ml frisch destilliertem Pyridin 2 Stunden bei 60° C erwärmt.

Die Oxydation von Hydroxylgruppen wurde mit 3% Chromtrioxyd in Eisessig durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann mit Methylenchlorid extrahiert.

Zur Reduktion wurden die Steroide in 0,5 ml wasserfreiem Methanol gelöst und mit 1,5 μ Mol Natriumborhydrid 2 Stunden bei Zimmertemperatur reduziert.

Alle chemischen Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie gereinigt und durch mitlaufende Referenzsubstanzen identifiziert.

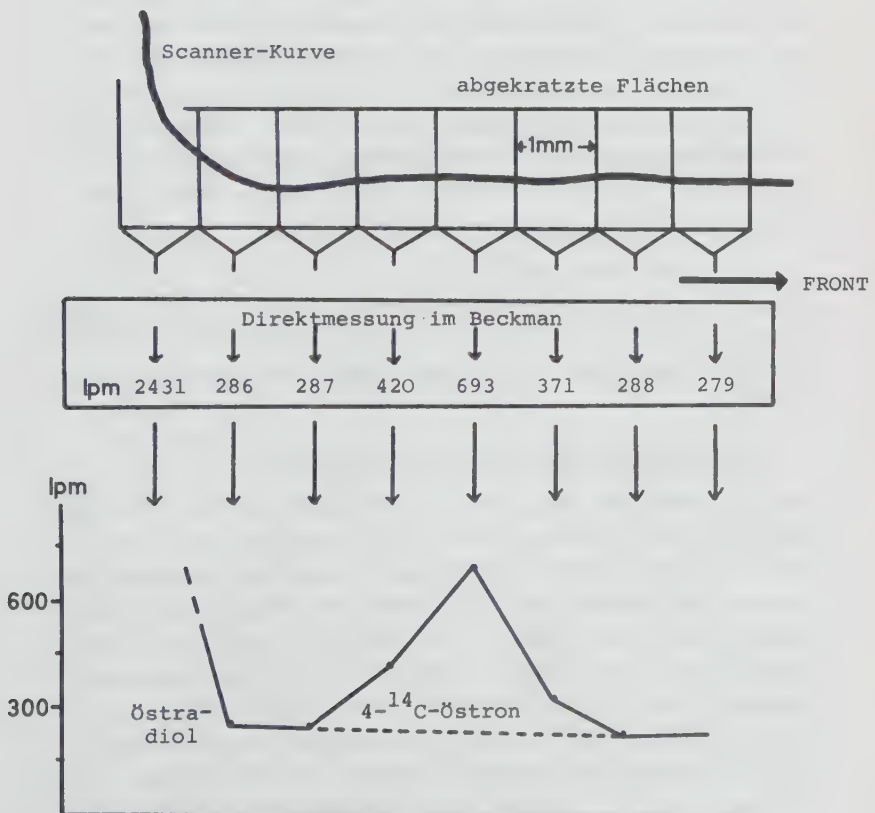
F. Radioaktivitätsmessung

Um die Reproduzierbarkeit bei der Direktmessung zu gewährleisten, ist die Verwendung von DC-Platten mit exakt gleicher Schichtdicke unbedingt notwendig.

Die Aktivitätsgipfel der Kurve wurden quantitativ elektronisch integriert. Die Zählrohrbeute auf den DC-Platten wurde durch geeichte Referenzsubstanzen bestimmt. Sie lagen bei einem Abstand des Dünnschichtzählrohres von 0,5 mm von der Oberfläche der DC-Platte für Tritium bei 0,8-1% und für ^{14}C bei 25-28%.

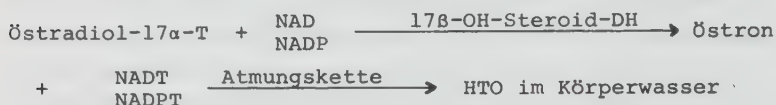
Die reinen radioaktiven Lösungen, sowie das Tritium-Wasser wurden mit Hilfe von Dioxan-Szintillationslösungen (2,5-Diphenyloxazol 5,0 / Naphthalin 100,0 / Dioxan ad 1 Liter)

in einem Flüssig-Szintillationsmeßgerät Modell LS 150 der Fa. Beckman gemessen. Die Zählhausbeute im Tritium- und ^{14}C -Energiekanal wurde mit einem externen Standard bestimmt. Kleinste radioaktive Mengen auf einer DC-Platte, die quantitativ durch die Integration nur ungenau zu bestimmen waren, wurden abgekratzt und mittels eines internen Standards direkt im Beckman LS 150 gemessen. Zur Messung des Östron-2,4,6,7-T bei der Cyclus-Abhängigkeit (s. Seite 44) wurde oberhalb des Östradiols zonenweise das Kieselgel abgeschabt und direkt im Flüssig-Szintillationszähler gemessen. Die Impulse/Min. wurden graphisch aufgezeichnet, so daß aus der neuen Aktivitätskurve die Östronmenge berechnet werden konnte:



G. Radiospirometrie

Durch "stoffwechsel-labile" Markierung mit Tritium gelingt es, die Oxydation von Steroiden in einem Organismus durch Messung von Umsatzquoten -durch Aktivitätsmessung des Atemwassers- zu verfolgen. Die Bestimmung der Östradioloxydation wird durch folgendes Schema entsprechend bestimmt:



Versuchsanordnung: Die entsprechende Menge Östradiol-17 α -T wurde intramuskulär injiziert. Anschließend wurden je 2 Tiere in einen speziellen, zylindrischen Plexiglaskäfig (Fa. Witels, Berlin) gesetzt, dem mit Schwefelsäure und Calciumchlorid getrocknete Luft zugeführt wird. Der von den Tieren an die Atmungsluft abgegebene Wasserdampf wird in einer Kühlfalle (flüssige Luft als Kühlmittel) ausgefroren. Die Kühlfallen wurden alle Stunde gewechselt; aus den Wasserproben wurde direkt die spezifische Aktivität in $\mu\text{Ci T/ml}$ gemessen. Die Östradioloxydation wird nach folgender Formel berechnet:

$$100 \cdot \frac{\mu\text{Ci/ml Atemwasser}}{\mu\text{Ci inj. Östradiol-17}\alpha\text{-T/ml Körperwasser}} = \text{Mindestoxydation}$$

Das Gesamtkörperwasser beträgt 64-68% des Gewichtes der Tiere (Lit. 32).

H. Bestimmung der Cyclusphasen bei Ratten

Nach Ascheim und Long (Lit. 35, 36) beträgt der Zwischenraum von 2 Funktionsperioden -die temporäre Folge der Brunst- 6 bis 8 Tage. Durch nachfolgend beschriebene Vaginaabstriche lassen sich die jeweiligen Phasen bestimmen. Technik des Abstriches: Den mit Äther narkotisierten Ratten werden mit einer kleinen Öse die Scheidensekrete ausgestrichen, die Sekrete auf einen Objektträger getupft und an der Luft getrocknet. Das Präparat wurde anschließend 5 Sekunden mit Methanol fixiert und mit Giemsa 1:20 gefärbt. Nach 25 Minuten wurde die überstehende Farblösung

mit Aqua dest. abgespült und an der Luft getrocknet. Das mikroskopische Bild des Ausstrichpräparates wurde nach folgenden Gesichtspunkten klassifiziert:

1. Diöstrus (Ruhephase, 50-60 Stunden)

Das Präparat weist zahlreiche Leukozyten, blaugefärbten Schleim und nur wenige polygonale, kernhaltige, kleine Zellen auf. Die Hämalaunfarbe überwiegt. Bei fortschreitendem Cyclus bilden sich immer mehr kernhaltige Zellen aus, bis zum

2. Proöstrus (mittlere Zeitdauer 12 Stunden)

Im ausgeprägten Proöstrus lassen sich kein Schleim und kaum noch Leukozyten nachweisen. Die vielen kernhaltigen Epithelzellen beherrschen das Bild.

3. Östrus (Brunstzeit, 10-18 Stunden)

Im frühen Östrus treten neben kernlosen, keratinisierten Vaginalschollen meist einzeln liegende, kernhaltige Oberflächenzellen auf. Im späten Östrus sind noch die verklumpten, trocken erscheinenden, sehr charakteristischen Schollen vorherrschend, vereinzelt sind wieder Leukozyten sichtbar.

4. Metöstrus (Nachbrunstzeit, 24-30 Stunden)

Die Zahl der Leukozyten hat wieder zugenommen. Daneben findet man im Frühstadium der 4. Phase noch Nachzügler des kernlosen, verhornten Zellstadiums. Gegen Ende des Metöstrus erscheinen im Bildfeld wieder die kernhaltigen, polygonalen Zellen.

(Lit. 37, 38).

F. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der von Wenzel et al. gefundene biochemische Antagonismus zwischen Hydroxy- und Ketosteroiden auch für Östradiol und Cortison gilt.

In Leberschnitten von Ratten wird das Nebennierenrindenhormon durch das vom Östradiol- 17α -T stammende Tritium an der 20-Ketogruppe zu 4-Pregnen- $17\alpha,20\alpha,21$ -triol-3,11-dion- 20β -T reduziert. Die Temperatur- und pH-Abhängigkeit, sowie die Michaelis-Menten-Konstante weisen auf eine enzymatische Reaktion hin. Die optimale Tritium-Übertragung wird nach 5 Minuten erreicht, da das Cortison rasch abgebaut wird (Halbwertszeit 30 Minuten).

Das Ausmaß der 20α -Hydroxycortison-Bildung in Lebergewebe hängt ausschließlich vom Verhältnis Donator- zu Akzeptorkonzentration und nicht nur von der absoluten Konzentration ab. Je größer der Quotient wird, desto mehr steigt der Anteil des Östradiol-Wasserstoffs an der Reduktion von Cortison. Bei Rattenweibchen stammen bei einer Konzentration von 10^{-6} Mol/l Östradiol fast 90% der zur Reduktion benötigten Wasserstoffatome vom Östradiol- 17α -T, bei männlichen Tieren ca. 70%.

Der Einfluß des Nebennierenrindenhormons auf die Östradioloxydation wurde in vivo und in vitro untersucht. Bei beiden Geschlechtern kann nach Gabe hoher Dosen von Cortison eine vermehrte Östradioloxydation gegenüber den Kontrollversuchen festgestellt werden.

Trotz geringerer Enzymaktivitäten konnte auch in anderen Organen der Ratten eine Cortisonreduktion durch Östradiol- 17α -T nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Tritium-Übertragung ist im Vergleich zur Leber, bis auf das Ergebnis in den Nieren, jedoch sehr gering, nur 1-2% der Gesamt-reduktion wird durch Östradiol- 17α -T induziert. Insbesondere wurde dabei im Uterus eine von den Cyclus-Phasen abhängige Oxydation von Östradiol zu Östron beobachtet, die durch Cortisonzusatz gehemmt wird.

Durch Erhöhung der Konzentration von Östradiol im Organismus steigt die Aktivität der uterinen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Diese Enzyminduktion ist außer von der Hormonmenge auch von der Dauer der Hormoneinwirkung abhängig. 16 Stunden nach Applikation von 5 mg Östradiol/kg Körpergewicht steigt die Enzyminduktion auf das 10fache an. Neben den Östrogenen Östradiol und Diäthylstilböstrol steigt auch nach 5 α -Androsten(3)-on(17)-Vorbehandlung die Enzymaktivität an, Upjohn 11-100 blockiert aber nur die Enzyminduktion durch Östrogene.

Die Zunahme der Enzymaktivität beruht auf einer DNS-abhängigen Neusynthese des Enzymproteins, da sich die Enzyminduktion durch Actinomycin hemmen läßt.

Eine mögliche Kontrollfunktion der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase auf die Hormonwirkung im Uterus wird diskutiert.

Die Michaelis-Menten-Konstante für Östradiol im Uterus beträgt $4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l (pH = 7,4). Bei Zusatz von 5 α -Androsten(3)-on(17) tritt eine nichtkompetitive Hemmung der Reaktion Östradiol zu Östron ein.

Die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ist substratspezifisch, denn neben Östradiol wird auch Metenolon und Testosteron, wenn auch in unterschiedlichem Maße, oxydiert.

In den Stoffwechselorganen Leber und Niere ist keine Induktion der anwesenden Dehydrogenase festgestellt worden.

Eine Parallelität zwischen Östradioloxydation und Tritium-Transfer durch die uterine Dehydrogenase ist nicht nachweisbar. Auch in anderen Organen tritt nach hormonaler Vorbehandlung kein verstärkter Tritium-Transfer auf. Eine mögliche Erklärung auf Grund der Enzymcharakteristika wurde beschrieben.

Zusammenhänge zwischen Östrogenausschüttung und Cortisontherapie wurden diskutiert.

G. LITERATUR

- 1 Wenzel,M., K. Pollow
und T. Ziebarth Z. Naturforschung
22b, 894 (1967)
- 2 Wenzel,M Biochim.Biophys.Acta
152, 431 (1968)
- 3 Wenzel,M., Langold,M.
und P. Hallac J. Biolog. Chem.
244, 4523 (1969)
- 4 Wenzel,M. und
W. Mützel Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.
351, 1221 (1970)
- 5 Leybold,K. und
H.J. Staudinger Biochem. Zeit.
331, 389 (1959)
- 6 Albaum,G. und
W. Staib Biochem. Zeit.
342, 120 (1965)
- 7 Schriefers,H., W.Cremer
und M. Ottc Z. Physiolog. Chem.
348, 183 (1967)
- 8 Schriefers,H.,F.Pohl
M. Pittel Acta endocrinol. (Copenhagen)
40, 40 (1962)
- 9 Hübener,H.J. und
D. Amelung Z. Physiolog. Chem.
293, 137 (1953)
- 10 Jensen,E.V. und
H.I. Jacobsen Recent Progr. Hormone Res.
18, 387 (1962)
- 11 Jütting,G. Acta endocrinol. (Copenhagen)
64, 145 (1970)
- 12 Lehmann,W.D. und
H. Breuer Naturwissenschaften
55, 182 (1968)
- 13 Bush,W. und
B. Sandberg J. biolog. Chem.
205, 783 (1953)
- 14 Henning,H.D. und
J. Zander Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.
300, 31 (1962/3)
- 15 Eik-Nes,K.B. und
C.E. Horning Gas-phase Chromatography of
Steroids, Springer Verlag
- 16 Hübner,H. und
H. Staib Biochemie der NNR-Hormone
Thieme Verlag, Stuttgart, 1965
- 17 McKenna,J.,R.Stubbs
J. Norymberski J. chem. Soc. (London)
Sect. C 2502 (1959)
- 18 Kinson,G.A. und
C.D. Kochakian Am. J. of Physiology
206, 443 (1964)

- 19 Schneider, J.J. und P.I. Horstmann J. biol. chem.
196, 629 (1952)
- 20 Cohn, G.L. und M. Hume J. clin. Invest
39, 1584 (1960)
- 21 Sweat, M.L. und M.J. Bryson Biochim. biophys. Acta
44, 217 (1960)
- 22 Wenzel, M., P.E. Schulze Z. Naturforschung
21b, 1178 (1966)
- 23 Wenzel, M., L. Pitzel Angewandte Chemie
80, 191 (1968)
- 24 Jarabak, J., J.A. Adams J. biol. chem.
237, 345 (1962)
H.G. Williams-Ashman,
und P. Talalay
- 25 Kolthoff, K.M. J. biol. chem.
63, 135 (1925)
- 26 Teorell, T. und E. Stenhagen Biochem. Z.
299, 416 (1938)
- 27 McIlvaine, T.C. J. biol. chem.
49, 183 (1921)
- 28 Sörensen, S.P.L. Biochem. Z.
22, 352 (1909)
- 29 Gomori, G. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)
68, 354 (1948)
- 30 Umbreit, W., R.H. Burris Manometric Techniques, Burgers
und J.F. Stauffer 149, 1959 (Minneapolis)
- 31 Wenzel, M. und P.E. Schulze in: Tritium-Markierung, Verlag
W. de Gruyter, Berlin 1962
- 32 Pace, N. und E. Rathbun J. biol. chem.
158, 667 (1945)
- 33 Staib, W., K. Dönges Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.
W. Teller 324, 32 (1961)
- 34 Kuss, E. Z. Physiolog.
349, 1234 (1968)
- 35 Ascheim, S. und B. Zondek Klin. Wschr.
1926, 5
- 36 Long, J.A. und H.M. Evans Mem. Univ. Calif.
1922, 6
- 37 Cohrs, P., R. Jaffé, in: Pathologie der Laboratori-
H. Meessen umstiere, Springer Verlag, 1953

- 38 Zarrow,M.X.,J.M.Yochim,
J.L. McCarthy Experimental Endocrinology
Academic Press,N.Y.-London 1964
- 39 Norymberski,J.K. und
G.G. Woods J. Chemic. Society
July, 3426 (1955)
- 40 Wenzel,M. und
S. Wolf Z. physiolog. Chem.
350, 1203 (1969)
- 41 Yates,F.E.,
S.E. Leemann, D.W.
Glenister,M.F.Dallmann Endocrinology
69, 67 (1961)
- 42 Morrison,K. und
N. Kilpatrick J.Obstet.Gynaec. brit.Cwlth.
76, 719 (1969)
- 43 Jung,G. Arch. Gynäk.
202, 14 (1965)
- 44 Björkelm,I. European J. Biochem.
8, 345 (1969)
- 45 Mueller,G.C. in: Karlson P., Mechanisms of
Hormone Action
Thieme, Stuttgart, 228 (1965)
- 46 Jensen,E.V. in: Karlson P., Mechanisms of
Hormone Action
Thieme, Stuttgart, 34 (1965)
- 47 Jensen,E.V. in: Karlson P., Mechanisms of
Hormone Action
Thieme, Stuttgart, 245 (1965)
- 48 Jung,H. Klin. Wschr.
39, 1169 (1961)
- 49 Berliner,D.L.
G.F.Leong,D.M.Cazes
M.L. Berliner Amer. J. Physiol.
202, 420 (1962)
- 50 Hisaw,F.L. Endocrinology
64, 276 (1959)
- 51 Cecil,H.C. und
J. Bitman Arch. Biochem.
119, 105 (1967)
- 52 Schmidt,H.,I.Noack
H.Walther,K.D.Voigt Acta endocr.
56, 231 (1967)
- 53 Breuer,H. in : Hoppe-Seyler/Thierfelder
Handbuch der phy. und path.
Analyse, Vol. 6/1 (1964)
423
- 54 Warren,J.C. und
R.D. Christ Arch. Biochem.
118, 557 (1967)

- 55 Lehmann, W.D. und
H. Breuer Hoppe Seylers Z.physiol.Chem.
348, 1633 (1967)
- 56 Jütting, G. Geburtsh. und Frauenheilk.
26, 636 (1966)
- 57 Jütting, G., K.J. Thun
E. Kuss Europ. J. Biochem.
2, 146 (1967)
- 58 Mützel, W. persönliche Mitteilung
(Schering AG)
- 59 Gregoire, A.T.
H. Ramsey, A. Adams J. Reprod. Fert.
14, 231 (1967)
- 60 Jensen, E.V. Dtsch. med. Wschr.
88, 1229 (1963)
- 61 Notides, A. und
J. Gorski Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)
56, 230 (1966)
- 62 Goodall, F.R. Arch. Biochem.
112, 403 (1965)
- 63 Nicolette, J.A. und
G.C. Mueller Biochem. biophys. Res. Comm.
24, 851 (1966)
- 64 Dellweg, H. Dtsch. med. Wschr.
91, 1967 (1966)
- 65 Jensen, E.V.
E.R. de Sombre,
P.W. Jungbluth in: Proc. 2nd Int. Congr.
Horm. Steroids
Milano, 1966
- 66 Duncan, G.W.,
St.C. Lyster, J.J.
Clark, D. Lednicer Proc. Soc. exptl. Biol. (N.Y.)
112, 439 (1963)
- 67 Langer, L.J. und
L.L. Engel J. biol. chem.
233, 583, (1958)
- 68 Endahl, G.L.
C.D. Kochakian und
D. Hamm J. biol. chem.
235, 2792 (1960)
- 69 Hecker, E. und
D. Betz Hoppe Seylers. Z.physiol.Chem.
338, 260 (1964)
- 70 Maas, H.G., K.D. Schulz
G. Bettendorf Arch. Gynäk.
202, 228 (1965)
- 71 Lisboa, B.P. und
H. Breuer Gen. comp. Endocr.
6, 114 (1966)
- 72 Kochakian, C.D. Proc. 4th Int. Congr.
Biochem Vienna, Vol IV,
Pergamon Press, London
- 73 Sekeris, C.E. 18. Colloqu. Gesellschaft
phy. Chemie, Mosbach, 1967

- 74 Bush, I.E. Ciba Found.Coll.Endocr.
Vol XI, Boston 1957
- 75 Sandberg, A.A., W.R.Slaunwhite jr.
und H.N.Antoniades Recent Progr.Hormone Res.
13, 209 (1957)
- 76 Daughaday, W.H. Physiol. Rev.
885 (1959)
- 77 Ulrich, F. Biochem. J.
68, 361 (1958)
- 78 Capsi, E.Y. und O.M. Hechter Arch. Biochem. Biophys.
53, 478 (1954)
- 79 Deckx, R., P.deMoor,
C.Denef, J.Raus Metabolism
14, 264 (1965)
- 80 Recknagel, R.O. J. biol. chem.
227, 273 (1957)
- 81 Tomkins, G. J. biol. chem.
218, 437 (1956)
- 82 Tomkins, G. Ann.N.Y. Acad.Sci. (Wash)
82, 836 (1959)
- 83 Ungar, F., M.Goldstein,
Chain-Mai Kao Steroids
5, 131 (1965)
- 84 Hübener, H., D.Fukushima,
T.Gallagher J. biol. chem.
220, 499 (1956)
- 85 Forchielli, E., K.Brown-Grant und
R.L. Dorfman Proc.Soc.exptl.Biol. (N.Y.)
99, 594 (1958)
- 86 Capsi, E.Y. und O.M. Hechter Arch. Biochem. Biophys.
61, 299 (1956)
- 87 Fukushima, D., H.L. Bradlow,
L.Hellman, B.Zumoff
und T.F.Gallagher J. biol. chem.
235, 2246 (1960)
- 88 Solomon, S., A.C.Carter,
S. Lieberman J. biol. chem.
235, 351 (1960)
- 89 Dobriner, K., S.Lieberman,
C.P.Roads, N.Jones,
V.Z.Williams und
R. Bowling-Barnes J. biol. chem.
172, 297 (1948)
- 90 Gallagher, T.F., D.K.Fukushima,
M.C.Barry, K.Dobriner Recent Progr. Hormone Res.
6, 131 (1951)

- 91 Breuer, H., K. Dahm,
D. Schmährl Naturwissenschaften
53, 203 (1966)
- 92 Forchielli, E. und
R. I. Dorfman J. biol. chem.
233, 443 (1956)
- 93 Dennis, P. M., A. Hughes,
G. H. Thomas J. Endocr.
40, 257 (1968)
- 94 Degenhardt, G.,
H. J. Hübener, L. Alester Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.
323, 278 (1961)
- 95 Hübener, H. J. Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.
322, 135 (1960)
- 96 Popjack, G., J. W. de Witt,
S. Goodman, R. H. Cornforth
und R. Ryhage J. biol. chem.
236, 1934 (1961)
- 97 Matthaei, H. und
M. W. Nirenberg Biochem. biophys. Res. Comm.
4, 404 (1961)
- 98 Brenner, S., F. Jacob
und M. Meselson Nature
190, 576 (1961)
- 99 Engel, M. G. und
F. L. Engel Endocrinology
58, 808 (1956)
- 100 Schaefer, H. E. und
R. Fischer Acta endocr. (Kbh)
57, 261 (1968)
- 101 Scott, D. M. B. und
A. G. Lisi Biochem. J.
77, 52 (1960)
- 102 Bo, W. J. und
M. S. Smith J. Reprod. Fert.
12, 237 (1966)
- 103 Singhal, R. L. und
J. R. E. Valadares Life Sci.
5, 1299 (1966)
- 104 Wiest, W. G. Endocrinology
73, 310 (1963)
- 105 Talalay, P. und
H. G. Williams-Ashman Recent Progr. Hormone Res.
16, 1 (1960)
- 106 Schneider, J. J. und
P. M. Horstman J. biol. chem.
191, 327 (1951)
- 107 Lipman, M. M., F. H. Katz,
J. W. Jailer J. clin. endocr. metab.
22, 268 (1962)
- 108 Berseus, O. und
I. Björkholm European J. biochem.
2, 503 (1967)
- 109 Warren, J. C. und
S. G. Cheatum Biochem. biophys. Acta
159, 540 (1968)

- 110 Schriefers, H. und
E. Waßmuth Hoppe Seylers Z.physiol.Chem.
338, 100 (1964)
- 111 Rubin, B.L. J. biol. chem.
227, 917 (1957)
- 112 Pollow, K. und
B. Pollow Hoppe Seylers Z.physiol.Chem.
351, 547 (1970)
- 113 Pollow, K., B.Pollow
und M. Wenzel Hoppe Seylers Z.physiol.Chem.
351, 1054 (1970)

Lebenslauf

Am 27. Dezember 1942 wurde ich als Sohn des Apothekers und Diplom-Chemikers Dr. Otto Hieronimus und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Andrae in Berlin geboren.

Am 1. September 1949 wurde ich in Uhlstädt (Thüringen) eingeschult. 1951 flüchteten meine Eltern und wir Kinder nach West-Berlin, wo ich bis zur Obersekunda die Schillerschule besuchte. Durch einen Wohnsitzwechsel innerhalb Berlins wurde ich auf die Walther-Rathenau-Schule, Berlin-Grünewald, umgeschult, wo ich am 13. Februar 1963 meine Reifeprüfung ablegte.

Mein erstes Praktikantenjahr absolvierte ich in der Berliner Apotheke des Städtischen Krankenhauses Westend, das zweite Jahr arbeitete ich in der Galenus Apotheke, Berlin-Halensee. Vor dem Berliner Prüfungsausschuß bestand ich am 18. März 1965 das Vor-examen.

Im Mai 1966 begann ich das Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg und bestand am 28. April 1969 vor dem Prüfungsausschuß in Hamburg unter Vorsitz von Herrn Prof. Dr. H. Kreutzkamp das pharmazeutische Staatsexamen.

Nach meiner halbjährigen Tätigkeit als Kandidat in der Schloß Apotheke, Berlin-Tegel, studierte ich ein Semester Medizin, um dann unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Wenzel mit der Promotionsarbeit zu beginnen.

Am 2. September 1969 schloß ich die Ehe mit der Apothekerin Ingeborg Stamm.

